

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología



**DISEÑO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO PULMONAR AGUDO
INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA EN PULMÓN PERFUNDIDO
AISLADO**

TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR:
Lisl Smit Bellot

DIRIGIDA POR:
Dr. D. José Ángel Lorente Balanza
Dra. Dña. Nuria Fernández Monsalve
MADRID, 2015

*“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”
(T.S. Elliot)*

AGRADECIMIENTOS

Al concluir tan arduo y exigente trabajo como es el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable sentir el vacío tan ansiado durante tantos años de entrega. Has aportado tu energía, tu trabajo, tu superación, tu economía y, sobre todo, tu tiempo. A pesar de este humano egocentrismo que te inunda cuando se hace un repaso de tan amplio trabajo, el análisis objetivo te muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado todo el proceso.

Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justa y consecuente con todas ellas, expresándoles mis agradecimientos.

En primer lugar, debo y quiero agradecer de manera especial y sincera a mi director de Tesis Dr. José Ángel Lorente por aceptarme bajo su dirección en tan prestigioso grupo de investigación como es el de H.U. Getafe que él mismo lidera. Sus ideas propias, siempre enmarcadas para mi orientación, han sido la clave de tan buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Su dirección y rigor, el respeto a mis sugerencias e ideas y su confianza hacen de José Ángel una persona a quien admirar fruto del reconocimiento de todos estos años. Gracias Director.

Quiero expresar también mi más afectuoso agradecimiento a mi directora Dra. Nuria Fernández por aceptar la propuesta de Tesis en su departamento de fisiología de la facultad de Medicina (UAM) y por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis en el momento de derrumbe. Debo destacar, por encima de todo, su cariño, amabilidad y su disponibilidad e interés por el trabajo. La oportunidad de presentar en sociedad nuestro trabajo me estimuló para seguir con fuerza e ilusión su desarrollo. Por todo ello gracias.

Agradezco de manera destacada y verdadera a la Dra. Leticia Martínez-Caro por su apoyo y confianza en mi trabajo. Su capacidad para guiar el desarrollo de tan complejo modelo ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora y como persona. Esos “pompones” siempre alzados, esos ánimos sinceros, esas estimulaciones continuas, ese trabajo del día a día con entusiasmo, ese conocimiento de Mc Giver que me dejaba perpleja en los momentos de sublevación del modelo *ex vivo*, ese aporte de energía cuando mi monitor estaba a cero, esa creatividad que he admirado todos estos años... Leti, contigo podría escribir un libro, permíteme que te lo diga en persona con una copa de vino sin gluten. Gracias compañera, mentora y amiga.

Aprovecho para agradecer también a los que he considerado como modelos de perfección durante este proceso Dr. Ángel Luís García Villalón y Dr. Prof Manuel Maceiras por compartir su experiencia y amplio conocimiento razón de la experiencia. No cabe duda que el entendimiento del objetivo para realizar una tesis es crucial y conseguir las habilidades de los mejores ha enriquecido el trabajo realizado y ha estimulado mi superación personal. Para los dos mis más sinceros agradecimientos. Los detalles son los que cuentan.

Quiero extender un sincero agradecimiento a nuestro grupo de investigación del HU Getafe, por su paciencia, disponibilidad y generosidad. Carolina, Antonio, Mariam, Raquel, Yenni y Alberto os agradezco por vuestras siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes

inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo, lo cual se ha visto reflejado en los buenos resultados obtenidos. Vuestra colaboración fue de gran ayuda durante mis estancias en el laboratorio. Además, ha significado el surgimiento de una amistad. Muchas gracias a todos vosotros.

Este trabajo ha cobrado más sentido, si cabe, por tener una continuación en mi desarrollo profesional en investigación en el H.U. La Fe (Valencia). A mis compañeros, en especial para María y Rebeca, os dedico unas palabras de agradecimiento por el apoyo y la paciencia durante mi formación en el Hospital en el momento cumbre de mi defensa de la Tesis. Esta revancha de la vida que me ha tenido exhausta pero que con el tiempo espero veré sus frutos.

Debo agradecer al FIS, por haber financiado este proyecto y dar la posibilidad de que la investigación en España sobreviva.

Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Ha sido un camino largo y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano. Sin embargo, como en todas las actividades de la vida, siempre al final hay algunos criterios que te permiten priorizar y es por ello que debo resaltar esos increíbles contactos.

Mi familia VEDEMA con los que compartí un pilar esencial de mi personalidad, “mi campito” con salidas ornitológicas a un nivel profesional y serio (gracias por compartir vuestro extenso conocimiento y vuestro humor, Fernando, Miguel, Fran, Juan, Simón...). Menciono especialmente a “mis niñas”, Encarna (la voz de la superación y valentía), Marta (el centro de mis risas y motor de las mejores ideas), Sole (mi noble y siempre pendiente amiga), Carmen (mi perdida pero en misma medida admirada). Vosotras, que me habéis hecho sentir arropada, querida, feliz, entendida y relajada en todo momento, os lo agradezco. Este tipo de amistad es la que te llena el espíritu que tanto el mundo pretende empobrecer cuando te empeñas en desarrollarte profesionalmente.

Para mis compañeros de la Universidad Alfonso X El Sabio, a pesar que con todos he tenido una excelente relación, debo destacar a mis “Uaxeros”, Noe, Jose, Sofi y Vanesa, a quien va un agradecimiento especial. Esos momentos de la comida y los pocos momentos de desconexión que me permití entre tanta obligación fueron inolvidables. Compañeros siempre generosos y dispuestos como pocos que compartieron conocimientos de la vida y experiencias de tipo personal que fueron de gran valor. Sois efectivamente “Lo mejorcito de la UAX”. Os echo de menos.

A mis amigas. Elena, aliada de la infancia que siempre ofrece su gran corazón y un oído para comprender. A Mirta, la esencia de lo más noble, con una inteligencia humilde que desborda y por ese amor que no le cabe en el pecho. A Julia, por esa creatividad madura y desbordante y esa quietud que tanto anhelo. A Alba, mi alumna más querida y amiga que me llena de frescura y cariño en cada contacto.

A mis amigos Xicotets, que han supuesto un respaldo y el aliento que necesitaba para emprender mi nueva vida en Valencia. A Shirley, que ha mostrado ser una mujer de su tiempo,

comprometida y con una valentía como pocas y que ha confiado en mí para el “enrole” en una etapa de investigación, nuevo pico en mi vida profesional. A todos mis amigos/as que siempre estáis ahí.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi FAMILIA. Sin su educación, apoyo e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa.

A mi madre que nos enseñó las bases de la auto-superación, que se dejó la juventud dándonos una formación y educación en términos académicos y personales, quien nos hizo entender que hay que llegar lejos para conseguir una buena autoestima, por esos cuidados y atenciones continuas. A mi padre, que me dio la cordura y la educación para respetar las señales de mi naturaleza cuando estoy exhausta. Él, que me inculcó que es tan importante trabajar como tener tu descanso, que siempre ha tenido unas palabras de aliento y cariño y una sonrisa con una historia divertida. Él me enseñó qué es la belleza del mundo. A mi hermana M^a Zee, por su ejemplo de lucha, tenacidad, superación y honestidad. Porque la entrega y protección más noble siempre sale del corazón y de eso anda sobrada. A mi hermano, porque me enseñó que TODO no es válido por un fin en sí mismo pero el amor no se rompe si uno no quiere. A mis suegros, ejemplo de entrega y dedicación. A mi gran familia, gracias.

Pero, sobre todo, para ti Jorge, el amor de mi vida, que has visto todo el proceso en directo. La persona que aunque no entendías, confiaste. La persona que más me ayuda, más fuerza me da, más me aconseja, más me inspira, que más feliz me hace, y la que más quiero porque me complementas la vida y me haces ver tus otros mundos posibles. Para ti, mi inconformista, es esta Tesis aunque tengas que compartirla con nuestra pequeña Naia que nos ha robado con dulzura la vida y el corazón. Por el tiempo que me habéis concedido, un tiempo robado a la historia familiar.

Para ti, mi Naia, ese sol que amanece todas las mañanas en nuestra habitación y nos hace sentir las personas más dichosas del mundo, que cada carcajada nos recarga, que cada palabra nos llena de ternura, que cada beso nos deshace y cada abrazo nos transporta. Ese arcoíris que ha teñido nuestra vida de lo más esencial del ser humano y nos ha impregnado de la idea principal de nuestra existencia, haciéndonos conscientes de las “bear necessities”, donde ha habido un punto de inflexión de prioridades. Gracias hija por abrirme los ojos y la mente. Eres meditación, eres fruto del amor y la admiración de tu madre. Te quiero pequeña. Para ti es todo este trabajo.

ABREVIATURAS

AECC	<i>American European Consensus Conference</i>
ALT	Alanina aminotransferasa (<i>alanine aminotransferase</i>)
AST	Aspartato aminotransferasa (<i>aspartate aminotransferase</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CRF	Capacidad residual funcional
DAD	Daño alveolar difuso
DB	Definición de Berlín
DHE	D ihidroetidio
DPA	Daño pulmonar agudo
E.g.	(<i>Exempli gratia</i>) por ejemplo
FIG	Figura
FiO ₂	Fracción inspirada de oxígeno
IL	Interleuquina
IRA	Insuficiencia respiratoria aguda
KS	Krebs
KS + S	Krebs con sangre
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Lactato deshidrogenasa (<i>Lactate dehydrogenase</i>)
LPC	Ligadura y punción del ciego
LPS	Lipopolisacárido
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos (<i>Macrophage inflammatory protein</i>)
PaO ₂	Presión parcial arterial de oxígeno
PAP	Presión arterial pulmonar
PBS	Buffer de fosfatos (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEEP	Presión positiva al final de la espiración (<i>Positive end-expiratory pressure</i>)
PIP	Presión inspiratoria pico en la vía aérea
RNS	Especies reactivas del nitrógeno (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>Reactive oxxygen species</i>)
SD	(<i>Sprague Dawley</i>)
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SDRAp	Síndrome de distrés respiratorio agudo pulmonar
SDRA ex	Síndrome de distrés respiratorio agudo extrapulmonar

SOD	Superóxido dismutasa
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VILI	Daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (<i>Ventilator induced lung injury</i>)
VM	Ventilación mecánica
V_T	Volumen tidal

Índices

1.1. Índice de Contenidos

ÍNDICES	1
1.1. Índice de Contenidos	3
1.2. Índice de Tablas	7
1.3. Índice de Figuras	9
INTRODUCCIÓN.....	11
2. DAÑO PULMONAR AGUDO.....	13
2.1. Concepto actual del daño pulmonar agudo. Criterios diagnósticos: desde la AECC (1994) hasta la Conferencia de Berlín (2012).....	13
2.2. Etiología y factores de riesgo.....	18
2.3. Impacto social	20
3. VENTILACIÓN MECÁNICA Y DAÑO PULMONAR AGUDO	22
3.1. La ventilación mecánica como tratamiento del DPA.....	22
3.2. La ventilación mecánica como causa de DPA.....	24
3.3. Fisiopatología del VILI.....	25
3.4. Biotrauma: desde el fallo por estrés a la disfunción orgánica	28
4. MODELOS EXPERIMENTALES DE DPA.....	31
4.1. El modelo de DPA inducido por la ventilación mecánica (VILI).....	32
4.2. VILI en diferentes sistemas biológicos.....	33
4.3. Modelos de DPA inducido <i>ex vivo</i> por la ventilación mecánica.....	35
4.4. Disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica... ..	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
1. HIPÓTESIS	45
2. OBJETIVOS.....	46
MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
1. METODOLOGÍA	49
1.1. Tipo de Estudio	49
1.2. Sujetos de Estudio	49
1.3. Preparación, Anestesia y Traqueostomía.....	49
1.4. Laparotomía, Toracotomía y Montaje en la Cámara Pulmonar	52
1.5. Protocolo de Ventilación Mecánica	55
1.6. Elementos del Sistema de Ventilación <i>Ex Vivo</i>	58
1.7. Obtención de Muestras	59
2. VARIABLES DE ESTUDIO.....	61
2.1. Valoración del daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica	61
2.1.1. Propiedades mecánicas: presión en la vía aérea	61
2.1.2. Estructura del pulmón: estudio histológico	61

2.1.3. Permeabilidad alveolo-capilar	61
2.1.4. Daño celular pulmonar	61
2.1.5. Cambios en el equilibrio ácido-base	62
2.1.6. Respuesta inflamatoria	62
2.1.7. Concentración de citoquinas.....	62
2.1.8. Expresión génica.....	62
2.1.9. Estrés nitrosativo.....	62
2.1.10. Estrés oxidativo.....	62
2.1.11. Efecto del daño pulmonar en la función de otros órganos	63
3. TÉCNICAS DE ESTUDIO	64
3.1. Histología pulmonar	64
3.2. Concentración de citoquinas.....	64
3.3. Expresión génica.....	65
3.4. Estrés nitrosativo: Western blot de 3-nitrotirosina	66
3.4.1. Extractos proteicos.....	66
3.4.2. Western Blot.....	66
3.4.3. Inmunofluorescencia indirecta a 3-nitrotirosina	67
3.4.4. Estrés oxidativo: fluorescencia a DHE	67
3.4.5. Estudio de la función vascular	68
3.4.6. Estudio de la relajación	72
3.4.7. Estudio de la contracción	73
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	76
RESULTADOS	77
6. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO DEL PULMÓN AISLADO SE ASOCIA CON DAÑO PULMONAR AGUDO	79
6.1. Resumen de los resultados del Objetivo 1	79
6.2. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP.....	80
6.3. Estructura del pulmón: estudio histológico	82
6.4. Permeabilidad alveolo-capilar: concentración de proteínas totales en el LBA y en el líquido de perfusión.....	83
6.5. Daño celular: actividad de ALT, AST y LDH.....	85
6.5.1. LBA	86
6.5.2. Líquido de perfusión.....	88
6.5.3. Ratio LBA / líquido de perfusión.....	90
6.5.4. Cambios en el equilibrio ácido-base	92
7. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO SE ASOCIA CON UNA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL	93
7.1. Resumen de los resultados del objetivo 2	93
7.2. Inflamación pulmonar.....	94
7.2.1. Concentración de Citoquinas	94
7.2.2. Expresión Génica	96
7.3. Estrés nitro-oxidativo: Nitración de proteínas	99
7.4. Estrés oxidativo	101

8. RESULTADOS DEL OBJETIVO 3: DEMOSTRAR QUE LA COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN MODIFICA LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO	103
8.1. Resumen de los resultados del Objetivo 3	103
8.2. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP	104
8.3. Estudio histológico	106
8.4. Permeabilidad alveolo-capilar	109
8.5. Daño celular: actividad de AST, ALT y LDH en el LBA y en el líquido de perfusión ..	112
8.5.1. LBA.....	112
8.5.2. Líquido de perfusión.....	115
8.5.3. Ratio LBA / líquido de perfusión.....	117
8.6. Equilibrio ácido-base	120
8.7. Inflamación pulmonar	121
8.7.1. Concentración de citoquinas.....	121
8.7.2. Expresión Génica.....	125
8.8. Nitración de proteínas	130
8.9. Estrés oxidativo	133
9. RESULTADOS DEL OBJETIVO 4: DEMOSTRAR QUE EL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA SE ASOCIA CON DISFUNCIÓN EN OTROS ÓRGANOS	135
9.1. Resumen de los resultados.....	135
9.2. Efectos de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la respuesta vascular	136
9.2.1. Respuestas vasoconstrictoras (Noradrenalina)	136
9.2.2. Respuestas vasodilatadoras (acetilcolina)	139
DISCUSIÓN	143
1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 1: DISEÑO DE UN MODELO DE DAÑO PULMONAR AGUDO EN UN SISTEMA DE PULMÓN AISLADO VENTILADO EX VIVO.....	145
1.1. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP	146
1.2. Estructura del pulmón: estudio histológico	147
1.3. Permeabilidad alveolo-capilar: concentración de proteínas totales en el LBA y en el líquido de perfusión	148
1.4. Daño celular: actividad de ALT, AST y LDH	149
1.5. Cambios en el equilibrio ácido-base	152
2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN DE PULMÓN AISLADO CON V_T ELEVADO SE ASOCIA CON UNA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL	155
2.1. Inflamación pulmonar.....	156
2.2. Concentración de citoquinas.....	156
2.3. Expresión génica.....	160
2.4. Estrés nitro-oxidativo.....	161
3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3: DEMOSTRAR QUE LA COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN MODIFICA LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO	165

3.1.	Consideraciones generales sobre la composición del líquido de perfusión	166
3.2.	Papel de los elementos sanguíneos en el líquido de perfusión.....	168
3.3.	Mecánica respiratoria: cambios en la PIP y estudio histológico	169
3.4.	Permeabilidad alveolo-capilar	171
3.5.	Daño celular: actividad de AST, ALT y LDH en el LBA y en el líquido de perfusion ..	172
3.6.	Equilibrio ácido-base	175
3.7.	Inflamación pulmonar: Concentración de citoquinas y expresión génica	176
3.8.	Nitración de proteínas y estrés oxidativo	179
4.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 4: DEMOSTRAR QUE EL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA SE ASOCIA CON DISFUNCIÓN EN OTROS ÓRGANOS.....	182
5.	DISCUSIÓN DE LIMITACIONES DEL ESTUDIO	186
5.1.1.	Limitaciones generales del modelo.....	186
5.1.2.	Limitaciones específicas del modelo <i>ex vivo</i>	188
5.2.	Potenciales bondades del modelo <i>ex vivo</i>	189
	BIBLIOGRAFÍA.....	191

1.2. Índice de Tablas

Tabla 1: Criterios de SDRA según la definición de Berlín.	16
Tabla 2: Causas de SDRA.	18
Tabla 3: Incidencia de los factores de riesgo asociados con el DPA.	19
Tabla 4: Efecto de la VM sobre el equilibrio ácido base.	92
Tabla 5: Variables relacionadas con la función y estructura del pulmón.....	111
Tabla 6: Actividad de diferentes enzimas en LBA.	115
Tabla 7: Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en el equilibrio ácido base, hematocrito y concentración sanguínea de lactato.	121
Tabla 8: Concentración y expresión génica de diferentes citoquinas en tejido pulmonar.....	130

1.3. Índice de Figuras

Figura 1. Histología pulmonar en el SDRA.....	16
Figura 2. Prevalencia de los diferentes hallazgos histológicos característicos del SDRA en diferentes períodos de tiempo tras el diagnóstico.....	17
Figura 3. Secuencia de aparición y evolución de las lesiones histológicas en el daño alveolar difuso a lo largo del tiempo tras el diagnóstico.....	17
Figura 4. Detalle del ventilador.....	50
Figura 5. Diagrama del ventilador.....	50
Figura 6. Aislamiento de la arteria carótida y de la tráquea.....	51
Figura 7. Canulación de la arteria carótida y traqueostomía.....	52
Figura 8. Canulación de la arteria pulmonar y la aurícula izquierda.....	53
Figura 9. Aspecto final del pulmón ventilado y perfundido.....	54
Figura 10. Esquema general del sistema de ventilación y perfusión de pulmón <i>ex vivo</i> , con cada uno de sus componentes.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11. Modelo de ventilación mecánica <i>ex vivo</i>	56
Figura 12. Diagrama del protocolo experimental.....	57
Figura 13. Detalle de la limpieza y corte de la aorta torácica de la rata para la valoración de la función vascular <i>ex vivo</i>	69
Figura 14. Esquema del protocolo del estudio de función vascular <i>in vitro</i>	70
Figura 15. Detalle de un anillo montado en el baño de órganos.....	71
Figura 16. Detalle del registro Acqknowledge®.....	72
Figura 17. Representación esquemática del estudio de reactividad vascular <i>in vitro</i>	74
Figura 18. Cambios en la PIP inducidos por la VM.....	81
Figura 19. Daño pulmonar inducido por la VM.....	82
Figura 20. Cambios histológicos inducidos por la VM.....	83
Figura 21. Concentración de proteínas en el LBA.....	84
Figura 22. Efecto de VM sobre la concentración de proteínas en el líquido de perfusión.....	85
Figura 23. Efecto de VM sobre parámetros de daño celular en el LBA.....	88
Figura 24. Efecto de VM sobre la actividad de ALT, AST y LDH en el líquido de perfusión.....	90
Figura 25. Efecto de VM sobre la ratio LBA / líquido de perfusión de ALT, AST y LDH.....	92
Figura 26. Efecto de VM con VT bajo o VT alto sobre la concentración de citoquinas en el tejido pulmonar.....	96
Figura 27. Efecto de VM sobre la expresión de genes (RT-qPCR) implicados en la respuesta inflamatoria en tejido pulmonar.....	99
Figura 28. Efecto de la VM en la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (Western blot).....	100
Figura 29. Efecto de la VM sobre la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar.....	101
Figura 30. Efecto de la VM sobre el estrés oxidativo producido.....	102
Figura 31. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la PIP y en la PAP.....	106
Figura 32. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios histológicos inducidos por la VM.....	107
Figura 33. Cambios histológicos inducidos por la VM (HE x20).....	108
Figura 34. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la concentración de proteínas en el LBA.....	110
Figura 35. Concentración de proteínas en el líquido de perfusión en los diferentes grupos.....	110

Figura 36. Concentración de proteínas en el líquido de perfusión en los diferentes grupos.	114
Figura 37. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la actividad de la ALT, AST y LDH en el líquido de perfusión.	117
Figura 38. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en el cociente LBA/líquido de perfusión de la actividad de ALT, AST y LDH.	119
Figura 39. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la concentración de citoquinas en el tejido pulmonar.	124
Figura 40. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la expresión génica en el tejido pulmonar.	130
Figura 41. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (Western blot).	132
Figura 42. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (inmunofluorescencia).	133
Figura 43. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en el estrés oxidativo (fluorescencia para DHE).	134
Figura 44. Respuesta vascular contráctil a diferentes dosis de noradrenalina de anillos normales de aorta de rata.	139
Figura 45. Respuesta vascular contráctil a diferentes dosis de acetilcolina de anillos normales de aorta de rata.	142

Introducción

2. DAÑO PULMONAR AGUDO

2.1. Concepto actual del daño pulmonar agudo. Criterios diagnósticos: desde la AECC (1994) hasta la Conferencia de Berlín (2012)

El daño pulmonar agudo (DPA) y el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) son síndromes de insuficiencia respiratoria aguda. El término **insuficiencia respiratoria aguda (IRA)** significa fallo de las funciones de la ventilación (intercambio de CO₂) o de la oxigenación.

En el presente texto nos referiremos de forma genérica al DPA para designar el *edema pulmonar no cardiogénico*, reservando el término SDRA para la forma más grave del síndrome.

El DPA consiste en un daño pulmonar inflamatorio ya sea de origen extrapulmonar (e. g., pancreatitis, quemaduras), o pulmonar (e. g., neumonía). Este daño desencadena un aumento de permeabilidad alveolocapilar y consecuentemente un edema intersticial y alveolar. Puesto que es difícil medir los cambios de permeabilidad capilar y alveolar en los pacientes, el diagnóstico del SDRA se basa en unos criterios que consideran la presencia de ciertos signos clínicos, y cambios en el intercambio gaseoso, en la hemodinámica y en la radiografía de tórax.

En este contexto, el **DPA/SDRA** se caracteriza por (i) inflamación pulmonar difusa y edema pulmonar de origen no cardiogénico, (ii) hipoxemia; (iii) infiltrados pulmonares bilaterales en la radiografía de tórax. El intercambio gaseoso debe estar deteriorado, tal como se mide por un cociente entre la presión parcial arterial de oxígeno (PaO₂) y la fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) ≤ 300 . Caracterizándose el SDRA con un intercambio gaseoso considerablemente deteriorado con una relación PaO₂/FiO₂ ≤ 200 .

La gravedad del síndrome viene determinada por (i) la disfunción celular en el contexto de la hipoxemia y la disminución del aporte de oxígeno a los tejidos; (ii) la inflamación pulmonar y de otros órganos, y la disfunción consiguiente de diferentes órganos.

Introducción

La causa más importante de hipoxemia es el cortocircuito (*shunt*) intrapulmonar, que se produce cuando la sangre fluye a través de alvéolos no ventilados (perfusión sin ventilación) y por tanto no participa en el intercambio gaseoso.

El SDRA es una entidad cuyo pronóstico depende no sólo de la afectación pulmonar, sino también del grado de afectación sistémica (1). Es interesante destacar que la mortalidad de los enfermos con IRA debida a DPA/SDRA no está causada por hipoxemia (es decir, por el fallo del pulmón) sino por disfunción multiorgánica, siendo esta la principal causa de muerte, generalmente secundaria a la sepsis. Una proporción pequeña de los pacientes fallece por hipoxemia refractaria que sólo da cuenta de un 9-19% de las muertes (2,3)

En su descripción original en 1967, Ashbaugh *et al.* describieron 12 casos de IRA en pacientes con trauma (7 pacientes), pancreatitis (1 paciente) e infección pulmonar viral (4 pacientes) en los que se observó hipoxemia grave, necesidad de ventilación mecánica (VM) y mejoría del intercambio gaseoso al aplicar presión positiva al final de la espiración (*positive end-expiratory pressure*, PEEP). Este síndrome se caracterizaba por una presentación aguda del cuadro, con mortalidad elevada y a menudo asociada con disfunción multiorgánica (4).

Debido a la gran variabilidad en el diagnóstico del SDRA y a la falta de acuerdo entre los especialistas sobre los criterios diagnósticos, en 1994 se reunió una conferencia de consenso, en la que participaron especialistas de EEUU y Europa (*American European Consensus Conference*, AECC) para proponer criterios objetivos para el diagnóstico del SDRA (5). En esta conferencia de consenso se determinaron los criterios clínicos requeridos para el diagnóstico del SDRA: (i) hipoxemia de presentación aguda ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$); (ii) infiltrado pulmonar bilateral radiológico; y (iii) presión de oclusión de la arteria pulmonar (PAP) menor de 18 mmHg o ausencia de evidencia de hipertensión auricular izquierda. Se define un tipo de SDRA más leve, con un intercambio gaseoso menos deteriorado ($200 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$), que se denomina DPA. Según esta definición, la única diferencia entre DPA y SDRA es el grado de deterioro del intercambio gaseoso.

Aunque este consenso formalizó unos criterios clínicos para el diagnóstico del SDRA fácilmente aplicables en los estudios clínicos, existen limitaciones relacionadas con la ausencia de criterios sobre las condiciones (FiO_2 , PEEP) en que ha de medirse el

Introducción

intercambio gaseoso. Para solucionar las limitaciones de la definición de la AECC se reunió en 2011 un nuevo panel de expertos, que propuso la denominada Definición de Berlín (DB) (6, 7).

La DB mejora la validez predictiva de mortalidad de la AECC y aclara tanto el modelo conceptual del SDRA como los criterios de definición del síndrome (8) y de su espectro de severidad (Tabla 1). Esto debería facilitar el reconocimiento de casos y estrategias de tratamiento más consistentes según la gravedad (9).

Según esta definición, los pacientes son clasificados en base al grado de severidad del daño pulmonar. Sin embargo, la DB no se encuentra exenta de limitaciones. Por un lado, no se contempla la posibilidad de volver a evaluar el grado de hipoxemia. Esta valoración temporal del deterioro del intercambio gaseoso es relevante puesto que existe una relación entre el grado de deterioro del intercambio gaseoso a las 24h tras el inicio del SDRA y el pronóstico (10). Por otro lado, la DB no protocoliza un patrón estándar de ventilación en un tiempo determinado para la evaluación de deterioro del intercambio gaseoso (10). Por lo tanto, se necesitan directrices más específicas basadas en un método estándar para evaluar la oxigenación con el fin de clasificar correctamente la gravedad de los pacientes con SDRA.

CRITERIOS DE SDRA DE LA DEFINICIÓN DE BERLÍN		
Tiempo de inicio de los síntomas		Inicio de los síntomas en la semana siguiente al evento relacionado (por ejemplo, neumonía) o bien nuevos síntomas respiratorios o agravamiento de los preexistentes.
Imagen radiológica		Opacidades pulmonares bilaterales en la radiografía o TC de tórax (no atribuibles a derrame pleural, atelectasias o nódulos pulmonares).
Origen del edema		Insuficiencia respiratoria no explicada completamente por enfermedad cardíaca o sobrecarga de fluidos. En ausencia de factores de riesgo de SDRA se recomienda excluir edema pulmonar hidrostático mediante ecocardiografía.
Oxigenación	Leve	$200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ con PEEP o CPAP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$
	Moderado	$100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ con PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$
	Grave	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ con PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$

Tabla 1: Criterios de SDRA según la definición de Berlín (9). SDRA, síndrome de distrés respiratorio agudo; TC, tomografía computarizada; CPAP, continuous positive airway pressure; FiO_2 , fracción inspirada de oxígeno; PaO_2 , presión parcial arterial de oxígeno; PEEP, positive end-expiratory pressure.

En conclusión, tras su descripción en 1967 por Ashbaugh *et al.*, (4) y la definición de la AECC (1994) (5), los criterios diagnósticos del SDRA se basan en la presencia de hipoxemia, infiltrados pulmonares y PAP no elevada. No existe un test diagnóstico específico y, por tanto, la aplicación de estos criterios de diagnóstico clínico está sujeta a una determinada sensibilidad y especificidad en comparación con el estándar de oro diagnóstico que es la presencia de signos histológicos característicos (11).

Para esta confirmación diagnóstica histológica se requiere de una biopsia pulmonar, muy rara vez realizada en estos pacientes, o la autopsia (8) (Fig. 1).

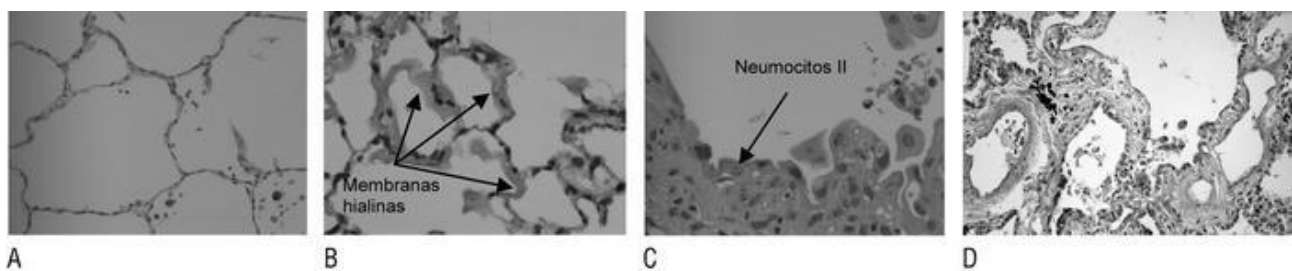


Figura 1. Histología pulmonar en el SDRA. (A) Alveolos de apariencia normal, con septos delgados. (B) pulmón con SDRA. La membrana basal del alveolo está recubierta por el material resultante de la destrucción de los neumocitos tipo I y que constituyen la membranas hialinas revistiendo el alveolo, (C) Neumocitos tipo II prominentes y de estructura cuboidea que revisten el alveolo en la fase respiratoria. (D) intersticio ensanchado con proliferación de fibroblastos (12).

Los cambios morfológicos característicos del SDRA se denominan daño alveolar difuso (DAD). Tal y como fue descrito por Katzenstein *et al.* en 1976 (13), estos cambios consisten en la presencia de membranas hialinas, edema intersticial, necrosis celular, proliferación y fibrosis (11).

Desde entonces, se ha asumido generalmente que estos cambios evolucionan en el tiempo en fases bien definidas (exudativa, proliferativa y fibrosis) que se caracterizan por cambios morfológicos específicos (13-15). Sin embargo, la secuencia temporal de estos cambios, propuesta en su descripción original pero nunca documentada en pacientes con SDRA, ha sido recientemente demostrada por nuestro grupo (8, 11, 16, 17). Estos

Introducción

cambios secuenciales de inflamación y reparación pueden superponerse en el tiempo. De hecho, es frecuente observar en el mismo paciente cambios correspondientes a diferentes fases evolutivas de la enfermedad (Fig. 2 y 3).

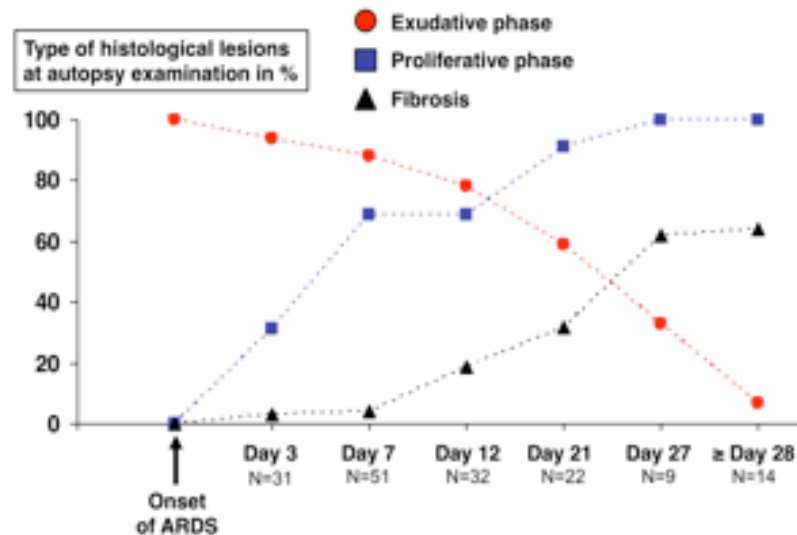


Figura 2. Prevalencia de los diferentes hallazgos histológicos característicos del SDRa en diferentes períodos de tiempo tras el diagnóstico (8)

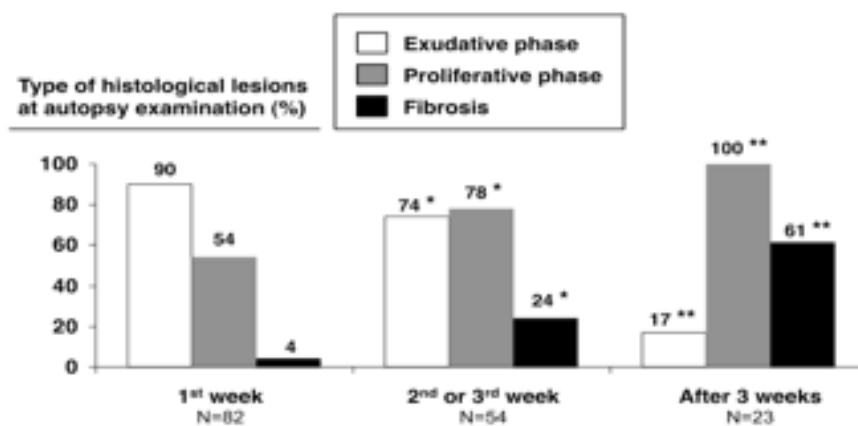


Figura 3. Secuencia de aparición y evolución de las lesiones histológicas en el daño alveolar difuso a lo largo del tiempo tras el diagnóstico. Las alteraciones que caracterizan al estadio exudativo y al proliferativo se superponen en el tiempo (8, 16).

El daño pulmonar inducido por la VM (**ventilator-induced lung injury, VILI**), tema central del presente trabajo de investigación, se asocia con cambios histológicos semejantes a los descritos para el SDRA en general (*vide infra*) (18, 19).

2.2. Etiología y factores de riesgo

El DPA puede desarrollarse debido a muy diferentes causas, que pueden ser (i) **enfermedades pulmonares** (daño pulmonar directo), como la neumonía, la contusión pulmonar o la aspiración de contenido gástrico; (ii) **enfermedades extrapulmonares** (daño pulmonar indirecto), como la sepsis, el trauma grave no pulmonar, o el shock (Tabla 2) (20).

Daño pulmonar directo (Pulmonar)	Daño pulmonar indirecto (Extrapulmonar)
Causas frecuentes: Neumonías Aspiración de contenido gástrico	Causas frecuentes: Sepsis Trauma severo no pulmonar con Shock Politransfusión
Causas menos frecuentes: Contusión pulmonar Embolismo graso Daño por inhalación Casi ahogamiento Edema pulmonar de reperfusión tras trasplante pulmonar o embolectomía pulmonar	Causas menos frecuentes: Sobredosis de drogas Pancreatitis aguda By pass cardiopulmonar

Tabla 2: **Causas de SDRA.**

De acuerdo con estudios epidemiológicos recientes, el daño pulmonar directo es más frecuente que el indirecto (55-75% de los casos de SDRA) (Tabla 3) (2, 21-23).

Incidencia de Daño Pulmonar Agudo	
Factor de riesgo directo	
Sepsis de origen pulmonar	24%
Shock séptico de origen pulmonar	35%
Aspiración de contenido gástrico	15-36%
Casi ahogamiento	33%
Contusión pulmonar	17-22%

Introducción

Inducido por ventilación mecánica	6-17%
Factor de riesgo indirecto	
Sepsis de origen no pulmonar	6%
Shock séptico de origen no pulmonar	13%
Transfusión de hemoderivados	24-36%
Coagulación intravascular diseminada	22%
Sobredosis	9%
Traumatismo	
En 1 región anatómica	<1%
En 2 regiones anatómicas	2,90%
En 3 o más regiones anatómicas	9-10%
By pass cardiopulmonar	2%
Quemaduras	2%

Tabla 3: Incidencia de los factores de riesgo asociados con el DPA (24).

La importancia en la diferenciación entre el origen pulmonar y extrapulmonar del DPA se debe a que, como ha sido señalado recientemente, existen diferencias en el patrón radiológico, en la mecánica pulmonar o en la respuesta al tratamiento.

Gattinoni *et al.* (25) estudiaron a 12 pacientes con SDRA de origen pulmonar (SDRAp) (11 pacientes con neumonía y uno con alveolitis hemorrágica) y a 9 pacientes con SDRA de origen extrapulmonar (SDRAex) (3 pacientes politraumatizados, 3 pacientes con peritonitis, 2 pacientes con infarto intestinal y uno con shock hemorrágico). A todos se les aplicaron diferentes niveles de PEEP y se analizaron los cambios en la mecánica respiratoria encontrando que los cambios son consistentes con una prevalencia de consolidación en los casos de SDRA de origen pulmonar y prevalencia de edema y colapso alveolar en el SDRA de origen extrapulmonar.

Goodman *et al.* (26) encuentran que el patrón radiológico del SDRAex es en vidrio deslustrado uniforme y simétrico, mientras que en el SDRAp la imagen en vidrio deslustrado es menos frecuente y los infiltrados son claramente asimétricos.

Lim *et al.* (27), encontraron una respuesta diferente a la posición prona de un grupo de 31 pacientes con SDRA, en cuanto al tiempo en el que se producen los cambios en la oxigenación, y los cambios en la mecánica respiratoria y en las imágenes radiológicas. En los casos de SDRAex se apreció un aumento más precoz de la oxigenación, una disminución de la *compliance* estática (que no cambió en SDRAp) y una disminución del *score* de consolidación pulmonar (que no cambió en SDRAp). Los autores concluyen ante

estos hallazgos que hay dos categorías de SDRA y que, incluso, se trata de dos síndromes distintos que pueden requerir diferentes pautas de tratamiento con VM.

El riesgo de SDRA aumenta si, en combinación con el **factor de riesgo principal**, el paciente presenta algún otro **factor predisponente**, como edad avanzada, el sexo femenino, abuso crónico del alcohol, tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica, la severidad de la enfermedad subyacente y la presencia de varios factores de riesgo (7).

2.3. Impacto social

La relevancia social del problema del DPA está bien documentada. Primero, la elevada mortalidad del DPA, afectando con frecuencia a pacientes jóvenes (víctimas de trauma, quemaduras o neumonía) (2, 3, 25, 26). Segundo, el tiempo prolongado de recuperación que requieren los supervivientes antes de incorporarse de nuevo a una vida laboral y social activa sufriendo tras el alta de UCI morbilidad pulmonar y extrapulmonar (21, 28-32). Tercero, la prevalencia creciente de esta enfermedad, al aumentar la frecuencia de los factores de riesgo (e. gr. trasplante pulmonar, epidemias de neumonía por virus de la influenza, edad más avanzada de la población, etc.) (1, 3, 4, 23, 24, 33).

Desde su primera descripción en 1967 el SDRA ha recibido más atención que ninguna otra entidad aislada dentro de los cuidados intensivos (34). Aproximadamente un 7-10% de los pacientes ingresados en UCI sufren DPA (20, 21, 35), y el 5-8% de los pacientes que reciben VM tienen este diagnóstico. Unos estudios recientes han estimado la incidencia entre 5 y 80 casos por 100,000 habitantes-año (2, 21-23, 33, 36-39) siendo la mortalidad del DPA entre un 35%-65% (3, 21, 30, 40-43).

Se trata, pues, de un síndrome con una elevada incidencia y una alta mortalidad. Sin embargo, a pesar de avances en la Medicina, en el conocimiento de la patogénesis de otras enfermedades, y en la implementación de nuevos y eficaces tratamientos para otras condiciones, la mortalidad del DPA no ha variado durante las tres últimas décadas (3, 21, 29, 40-42, 44-46). En una revisión sistemática rigurosa publicada en 2009 se determinó que la mortalidad del SDRA se ha mantenido estable (44% en estudios observacionales y

Introducción

36% en estudios aleatorizados), desde que la definición de la AECC fue publicada (30). Por otro lado, ningún tratamiento (a excepción del uso de volumen corriente bajo en la VM de estos pacientes y quizá la posición prona y el uso de relajación neuormuscular) se ha demostrado eficaz (47-50).

3. VENTILACIÓN MECÁNICA Y DAÑO PULMONAR AGUDO

3.1. La ventilación mecánica como tratamiento del DPA

Los enfermos con SDRA presentan aumento del espacio muerto, disminución del volumen tidal (V_T) y reducción de la distensibilidad pulmonar, lo cual contribuye al incremento del trabajo respiratorio y de los requerimientos energéticos para lograr una ventilación adecuada.

Los mecanismos que determinan una limitación del volumen pulmonar para recibir el V_T insuflado son el edema intersticial y alveolar (51, 52).

El primer lugar, el **edema intersticial** se caracteriza por una disminución de la capacidad residual funcional (CRF) y la presencia de áreas de colapso alveolar. La lesión de las células epiteliales y la existencia del edema empeora la formación y actividad del surfactante (53). La función primaria del sistema surfactante consiste en facilitar la mecánica respiratoria, minimizando la energía que el tejido pulmonar debe aportar para mantener abierta y expuesta la superficie de intercambio gaseoso durante los ciclos de inspiración-espriación. La presencia de edema en el intersticio alveolo-capilar en los casos de SDRA altera el surfactante por la lesión de los neumocitos II, produciéndose colapso alveolar (53-55). Esta alteración se resuelve mediante la VM, sustituyendo la función pulmonar de forma mecánica, permitiendo el descanso muscular (*vide infra*). A su vez, esta lesión provoca el desprendimiento de los neumocitos tipo I dejando al desnudo la membrana basal, sobre la que se depositan diversos restos formando las conocidas membranas hialinas (cambio morfológico del DAD utilizada para el diagnóstico de SDRA). Estas membranas están constituidas por fibrina y detritus procedentes de la destrucción de los neumocitos tipo I, como se puede observar con microscopía electrónica (Fig. 1) (12, 56-58).

El surfactante también posee una función en la defensa inmune innata. El deterioro en su formación y función se asocia con una mayor susceptibilidad a la invasión de patógenos en general.

Introducción

El volumen pulmonar puede restablecerse y las unidades alveolares colapsadas pueden abrirse mediante un aumento de la presión en la vía aérea mediante “maniobras de reclutamiento alveolar” (59-61). En la actualidad se considera que las lesiones pulmonares no son homogéneas, con 1/3 del tejido pulmonar normal, otro 1/3 de tejido reclutable mediante VM y el 1/3 restante funcionalmente irrecuperable. Esto quiere decir que sólo el 30% del pulmón es capaz de funcionar normalmente, de ahí que haya recibido el sobrenombre de **baby lung** (pulmón de recién nacido), pues en el SDRA el pulmón, más que presentar un aumento de la rigidez, presenta un volumen de tejido sano reducido (es más pequeño que rígido) (52). Por otro lado, la presión positiva en la vía aérea permite el aumento del volumen pulmonar y la mejoría del intercambio gaseoso. La PEEP consiste en el mantenimiento de un cierto nivel de presión positiva en el alveolo a lo largo de todo el ciclo respiratorio. La aplicación de PEEP permite mantener abiertos a alveolos reclutados y evitar el colapso de nuevas unidades alveolares. El aumento del volumen pulmonar mejora el intercambio gaseoso. La VM, por tanto, constituye una importante medida de tratamiento de pacientes en situación de IRA.

En segundo lugar, el edema alveolar (**inundación alveolar**). En este mecanismo, explicativo de la limitación del V_T , la CRF no se modifica con la aplicación de PEEP, debido a que existe ocupación de unidades alveolares por parte de proteínas y detritus. Esta ocupación alveolar limita el reclutamiento, de tal manera que durante una insuflación el volumen se distribuye hacia las zonas normalmente aireadas; por este motivo, el aumento del volumen pulmonar ocurre principalmente a expensas de un incremento en el radio alveolar de las unidades previamente abiertas, lo que favorece la “sobredistensión” (62-64).

En resumen, la VM no es sino una medida de soporte de la función pulmonar que se aplica mientras la estructura y función pulmonares mejoran con el tratamiento de la causa de la IRA (65). La VM puede reducir el *shunt* y mejorar la oxigenación por dos mecanismos: por un lado, la aplicación de presión positiva inspiratoria produce la apertura y la expansión de los alvéolos colapsados (reclutamiento alveolar), y por otro, la utilización de PEEP previene el colapso de los alvéolos previamente abiertos por la presión inspiratoria (mantiene el reclutamiento alveolar), incrementa la CRF (volumen pulmonar al final de la espiración) y mejora el equilibrio entre ventilación y perfusión. En caso de edema pulmonar, la PEEP también puede mejorar la oxigenación mediante la

redistribución del agua pulmonar desde los alveolos hacia el intersticio, aunque no reduzca el contenido de agua extravascular pulmonar. Por otra parte, niveles apropiados de PEEP pueden ayudar a prevenir la lesión pulmonar inducida por el ventilador, al evitar la apertura y el cierre de los alvéolos de forma cíclica (*vide infra*).

3.2. La ventilación mecánica como causa de DPA

Aún siendo la VM un tratamiento que ha permitido salvar la vida de numerosos enfermos con IRA, hoy es reconocido que se trata de una intervención que *per se* puede causar daño pulmonar (66, 67). El daño pulmonar agudo inducido por la VM (ventilator-induced lung injury, *VILI*) consiste fisiopatológicamente en inflamación pulmonar aguda y difusa, y edema pulmonar por hiperpermeabilidad alveolo-capilar. La patogénesis y fisiopatología son comunes a las reconocidas para el DPA en general (68). El *VILI* se trata, pues, de una forma específica de DPA, en la cual el daño pulmonar está causado por un estímulo físico, el estiramiento tisular originado por la sobredistensión alveolar (*vide infra*). El *VILI* se caracteriza por disfunción del surfactante y cambios histológicos indistinguibles de los descritos para el SDRA (alveolitis neutrofílica, formación de membranas hialinas, fibrosis en estadios avanzados, es decir, DAD) (69).

Se puede producir *VILI* tanto en pulmones sanos (70) como en pulmones previamente dañados (e.g., mediante la inducción de una situación de sepsis, o la administración intratraqueal de ácido clorhídrico, o el lavado broncoalveolar repetido para eliminar el surfactante pulmonar) (71-73). Aunque es el *VILI* inducido en pulmones previamente lesionados es de mayor intensidad que el inducido en un pulmones previamente sanos (74, 75).

El V_T tradicionalmente pautado a enfermos con IRA que reciben VM en la UCI se encontraba en el pasado alrededor de 10 ml/kg. En ocasiones, con el objeto de expandir el pulmón colapsado o en ciertas condiciones durante una intervención quirúrgica, se podían utilizar V_T más elevados aún (e.g., 15 ml/kg). El concepto del *baby lung* (*vide supra*) cambió el paradigma de la comprensión de la estructura y función pulmonares en condiciones de DPA. La presencia de amplias áreas de colapso alveolar explica que el V_T administrado no se distribuya en las áreas enfermas, sino sólo en las áreas sanas,

produciendo sobredistensión de las unidades alveolares abiertas (76-78). Este conocimiento ha hecho que el objetivo de la VM no sea tanto mantener una oxigenación (PaO_2) y ventilación (PaCO_2) en el rango normal, como evitar la sobredistensión y el cizallamiento cíclicos del tejido pulmonar, tanto de las zonas dañadas como de las próximas a ellas y susceptibles también de lesión.

El estudio publicado por la *ARDS Network* en 2000 (79) supuso un significativo avance en el empleo de VM en los pacientes con DPA/SDRA. Este estudio planteó la hipótesis de que la VM utilizando V_T elevados (12 ml/kg) produce daño pulmonar y respuesta inflamatoria sistémica asociada a este daño pulmonar. La estrategia basada en el uso de V_T bajos (6 ml/kg) intenta la protección pulmonar, tolerándose ciertos niveles de hipercapnia y de acidosis respiratoria. El principal resultado del ensayo clínico fue que el grupo que recibió V_T bajo precisó menor duración de la VM como soporte, menor fracaso de órganos y menor mortalidad (39,8% *versus* 31,0%).

Es muy interesante la observación de que la disminución de la mortalidad en el ensayo clínico no se debió a mejoría de la oxigenación ni a reducción del barotrauma, sino a la menor incidencia de disfunción multiorgánica (79). Además, el grupo ventilado con V_T bajo presentó menor concentración de IL-6 en suero al tercer día del estudio, con reducción mayor a lo largo de los días de ingreso. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la protección del pulmón tiene efectos sistémicos beneficiosos.

3.3. Fisiopatología del VILI

En las publicaciones iniciales se asumía que el daño inducido por la ventilación se relacionaba únicamente con el desarrollo de las distintas formas de barotrauma. Actualmente se considera también daño inducido por la VM formas más sutiles de daño que se manifiestan como cambios morfológicos, estructurales y fisiológicos. El reconocimiento de que la sobredistensión alveolar más que las altas presiones proximales en la vía aérea, es el principal determinante del daño pulmonar (volutrauma más que barotrauma) (80), ha constituido un cambio sustancial en el conocimiento de la patogénesis del VILI.

El concepto de barotrauma fue expandido por los hallazgos de Dreyfuss *et al.*, quienes demostraron un aumento de la permeabilidad capilar y edema pulmonar en ratones sanos ventilados con un V_T elevado (81, 82). La cuestión del papel relativo del aumento del volumen (**volutrauma**) o presión (**barotrauma**) en la inducción el daño pulmonar fue abordado por un estudio en el que se ventilaron ratas con V_T elevado con un dispositivo (cinta toracoabdominal) que evita la expansión del tórax (V_T normal y presión inspiratoria pico en la vía aérea [PIP] elevada) o sin el dispositivo (V_T elevado y PIP elevada) (82). Las ratas en las que no se permitió un aumento del volumen torácico (sólo aumentó la PIP) no presentaron daño pulmonar, a diferencia de aquellas en las que se aplicaba un V_T elevado y se permitía un aumento del volumen torácico. En otro estudio se ventilaron ratones utilizando un pulmón de acero con presiones negativas y grandes volúmenes corrientes, y en ellos también apareció edema pulmonar, aun en ausencia de PIP positiva. Estos resultados contribuyeron a la aceptación del concepto de que es el volumen más que la presión el factor que contribuye al daño pulmonar (82).

El uso de V_T elevados en la VM origina un incremento de la permeabilidad de la barrera alveolocapilar a las proteínas. Diferentes estudios han encontrado un mayor coeficiente de filtración durante la VM (83, 84) lo cual obedece a una reducción de la integridad de la barrera alveolocapilar y sugiere que durante la VM se lesionan las células epiteliales y endoteliales.

Otro factor que actúa en combinación con el volutrauma para inducir daño pulmonar es la apertura y cierre cíclico de unidades alveolares que permanecen cerradas durante la inspiración y se abren al aplicar presión positiva en la vía aérea durante la espiración. Este mecanismo se conoce con el nombre de **atelectotrauma** (85, 86).

Además de estas alteraciones que podemos clasificar como lesiones mecánicas, uno de los puntos más interesantes de la lesión pulmonar asociada a VM y de mayor relevancia para la presentación de este trabajo es la capacidad del pulmón para liberar sustancias pro-inflamatorias e inducir una respuesta inflamatoria sistémica en condiciones de sobredistensión.

En años recientes se ha evidenciado que la ventilación también puede inducir el reclutamiento y activación de células inflamatorias en el tejido pulmonar dañado y la producción de numerosos mediadores inflamatorios que juegan un papel importante en el

comienzo y propagación de la lesión pulmonar. Este fenómeno ha sido denominado **biotrauma** (87-93). De entre todos los mediadores (incluyendo derivados de ácido araquidónico, factores de coagulación, mecanismos de lesión y reparación de la membrana celular, etc.), las citoquinas y las quimioquinas forman el grupo más importante y nos centraremos en ellas. La apoptosis es otro mecanismo de lesión alveolar y endotelial que, por su estrecha relación con la respuesta inflamatoria, será tratado conjuntamente.

La capacidad del pulmón de mantener y propagar la respuesta inflamatoria (91, 94) en ciertas condiciones mecánicas (e.g, sobredistensión) explicaría que la mayoría de los pacientes con DPA no fallecen en situación de hipoxemia refractaria (50, 95), sino en situación de disfunción multiorgánica (34, 96), así como el desarrollo de fracaso multiorgánico en el contexto de SDRA (97, 98).

Otro aspecto relacionado con la VM y que puede contribuir potencialmente al daño pulmonar es la **toxicidad por oxígeno**. Se considera que el estrés oxidativo es un importante mecanismo de daño pulmonar agudo en pacientes con enfermedades como el SDRA. En humanos y animales la aplicación de FiO_2 alta produce daño pulmonar probablemente a través del incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (99-102). En la actualidad, el manejo de los pacientes con SDRA incluye el uso de una FiO_2 tan baja como sea posible, planeando objetivos de oxigenación más modestos que en el pasado (e.g., $\text{SaO}_2 \geq 88\%$) (103, 104).

La patogénesis de la lesión pulmonar aguda se sustenta por tanto en 4 pilares fundamentales: a) daño endotelial y epitelial; b) activación de células inflamatorias; c) balance entre citocinas pro y antiinflamatorias y d) necrosis y apoptosis (87).

A la compleja interacción entre estos mecanismos se añade una quinta vía de lesión, producida por el estrés mecánico que supone la VM.

3.4. Biotrauma: desde el fallo por estrés a la disfunción orgánica

El pulmón en el DPA es actualmente visto como un órgano más de la economía que se encuentra involucrado en el síndrome de disfunción orgánica múltiple como resultado del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, caracterizado por una activación de leucocitos mediada por citoquinas (105-107). Los leucocitos en el pulmón, por lo tanto, responden y contribuyen al proceso inflamatorio en el DPA. Existe una activación de leucocitos en el tejido pulmonar, produciendo una respuesta inflamatoria local con posterior vertido de mediadores inflamatorios a la circulación general (108).

La VM se asocia con alteraciones a nivel de las células epiteliales y del endotelio vascular en respuesta a diversos estímulos nocivos (*vide supra*), dando lugar a un aumento de permeabilidad alveolo-capilar (109-112), formación de edema en el espacio alveolar, infiltración de neutrófilos activados, y desarrollo de una respuesta inflamatoria a nivel local y sistémico (113-116). El estiramiento cíclico induce cambios en la expresión de genes (99, 117) y en las vías de señalización intracelular aun en ausencia de lesión pulmonar previa. Desde estas células se producen y liberan interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-8 y IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF α), factor activador de plaquetas, oxidantes y proteasas (88).

Se ha denominado **mecanotransducción** al mecanismo por el que un estímulo mecánico (estiramiento tisular) se traduce mediante activación de receptores de membrana celular en vías de señalización intracelular (53).

El papel del pulmón como modulador de la inflamación en condiciones de VM fue señalado por varios trabajos seminales. Vlahakis *et al.* (106) demostraron *in vitro* que el estiramiento de macrófagos alveolares causaba liberación de citoquinas y proteasas y que el estiramiento cíclico incrementaba la expresión de IL-8 y TNF α en células alveolares y bronquiales. La mayoría de los genes activados pertenecen a dos procesos biológicos: la inflamación y la coagulación (IL-1 beta [IL1 β], IL-6, quimioquina-2, ciclooxigenasa A2 y activador del plasminógeno tipo 1, factor tisular y urokinasa). Narimanbekov y Rozycki (118) demostraron en un modelo en conejos de VM e hiperoxia que la inhibición del efecto

de la IL1 β se asociaba con una disminución de la respuesta inflamatoria. Varios trabajos subsiguientes comprobaron la presencia de mediadores pro- y antiinflamatorios en el líquido del lavado broncoalveolar (**LBA**) de animales sometidos a VILI (88, 115, 119).

Numerosos estudios en modelos animales han demostrado la relación entre la estrategia de VM y el grado de respuesta inflamatoria (88, 115, 119-124). Tremblay *et al.* (120) diseñaron un estudio en el que pulmones aislados de rata fueron ventilados con distintos V_T y niveles de PEEP. Se analizó después en el LBA los niveles de distintas moléculas (TNF α , IL1 β , IL-6, IL-10, MIP-2 e IFN-gamma) (10, 89, 116, 124). Todas ellas aumentaron de forma significativa en el grupo de pulmones ventilados con los parámetros nocivos (V_T elevado, PEEP=0). Estudios de inmunohistoquímica sugirieron que las citoquinas parecían provenir de las células epiteliales del pulmón (90).

La liberación de mediadores inflamatorios por el pulmón sometido a ciertas condiciones de VM no queda circunscrita al espacio alveolar, sino que los mediadores también son translocados al espacio intravascular proporcionando así un mecanismo por el cual el pulmón puede modular la respuesta inflamatoria sistémica (74, 94, 105, 119, 125).

También se ha demostrado que se produce traslocación de bacterias desde el espacio alveolar hacia la circulación dependiendo de las condiciones de VM. Nahum *et al.* (126) estudiaron en perros la influencia de distintas estrategias de VM en la translocación de *Escherichia coli* desde el pulmón a la circulación. Se observó que las bacterias aparecían en la sangre en mayor porcentaje con el uso de estrategias nocivas de VM. Estos resultados proporcionan un mecanismo potencial adicional explicativo del papel modulador de la respuesta inflamatoria sistémica por el pulmón en condiciones de distensión tisular.

Otros estudios han demostrado disfunción multiorgánica en relación con el VILI, como indican los hallazgos de hipotensión arterial, fracaso renal agudo, alteración de la permeabilidad intestinal y aumento de transaminasas en animales sometidos a VILI (115, 127). Estos hallazgos apoyan el papel del pulmón como generador de respuesta inflamatoria en ciertas condiciones de VM. El fenómeno por el cual un insulto inicialmente pulmonar se manifiesta de forma sistémica se denomina **descompartmentalización** de la respuesta inflamatoria (74, 90, 94, 97, 115, 122, 128-133).

Introducción

En los estudios realizados con animales llama la atención la rapidez con la que se produce la lesión pulmonar, especialmente con animales pequeños (e.g., roedores). Se ha propuesto que en modelos en animales pequeños las lesiones tienen un origen puramente mecánico por el cizallamiento del tejido pulmonar con la ventilación, y que en animales de mayor tamaño se combinan factores mecánicos e inflamatorios (134). Sin embargo, parece que en roedores debe jugar también un papel el proceso inflamatorio relacionado con el biotrauma, ya que se ha demostrado al igual que en otras especies- aumento de citoquinas en el LBA y en el suero, así como atenuación de las lesiones con agentes antiinflamatorios como la dexametasona (75, 115).

En síntesis, se ha postulado que los mecanismos principales por los que el VILI puede inducir disfunción multiorgánica son (87): (a) fallo por estrés de la barrera endotelial y epitelial alveolar, facilitando así la descompartimentalización de la respuesta inflamatoria; (b) fallo por estrés de la membrana plasmática (necrosis/apoptosis); (c) alteraciones en la estructura del citoesqueleto sin daño ultraestructural; (d) efectos en la vasculatura independientes del estiramiento o la ruptura; (e) estiramiento cíclico, que ha sido implicado en el fallo del proceso de regeneración epitelial.

4. MODELOS EXPERIMENTALES DE DPA

El mecanismo fundamental por el que se inicia y propaga el daño pulmonar aún no ha sido desvelado completamente. Estudios en humanos han permitido conocer información sobre el inicio y evolución de los cambios fisiológicos e inflamatorios en el pulmón sometido a VM (88). Esta información nos ha permitido plantear algunas hipótesis sobre los mecanismos del daño. Sin embargo, no es posible probar estas hipótesis en pacientes debido a la dificultad del diseño experimental en general en humanos.

Los modelos animales nos proporcionan un medio para evaluar directamente en organismos complejos y en sistemas vivos intactos las hipótesis sobre la patogénesis y efectos de diferentes intervenciones terapéuticas de forma simple y rápida, así como para validar en condiciones más fisiológicas los hallazgos en modelos celulares.

Idealmente, un modelo animal de SDRA debería incorporar por lo menos una o más características del SDRA en humanos, incluyendo un desarrollo agudo del proceso después de recibir el estímulo, y cambios en la función (e.g., alteración del intercambio gaseoso, hiperpermeabilidad alveolo-capilar) o en la estructura (disminución de la *compliance*, formación de edema, aumento de la ratio peso húmedo/peso seco, cambios histológicos indicativos de DAD) pulmonares.

Existen numerosos modelos experimentales de DPA inducido por diferentes factores (e.g., sepsis, transfusión múltiple, trauma, aspiración del contenido gástrico, exposición a altas concentraciones de oxígeno, reperusión de tejidos isquémicos). La administración por diferentes vías (intraperitoneal, intravenosa, intratraqueal) de endotoxina (Lipopolisacárido, LPS) es uno de los modelos más utilizados de DPA (135). El LPS es un potente agente biológico que estimula el sistema inmune innato y permite el estudio de las vías de señalización implicadas en el daño pulmonar agudo tras un insulto inflamatorio. El estímulo con LPS es un insulto puramente inflamatorio, no bacteriano (ni microbiológico en general). Por tanto, el modelo de daño inducido mediante la administración de LPS no se trata *sensu stricto* de un modelo de DPA inducido por la sepsis (136).

Otro modelo de DPA inducido por un estímulo inflamatorio es el inducido por la instilación de ácido oleico (137). Es altamente reproducible y permite estudiar, tanto en

grandes como pequeños animales, los cambios asociados al uso de diferentes estrategias ventilatorias, mecanismos patogénéticos y cambios fisiopatológicos asociados al DPA, incluyendo mecanismos de alteración del intercambio gaseoso.

Puesto que la sepsis es el factor de riesgo más común para el desarrollo de DPA, se han estudiado ampliamente modelos de DPA inducido por la sepsis. Entre los modelos de DPA inducido por la sepsis cabría citar cualquier modelo de sepsis en general. Un modelo ampliamente utilizado para inducir sepsis, y que se acompaña de DPA, es el modelo de peritonitis inducida mediante ligadura y punción del ciego (LPC) (75, 138, 139).

4.1. El modelo de DPA inducido por la ventilación mecánica (VILI)

Un modelo de DPA de gran relevancia clínica es el inducido por la VM (VILI). En efecto, el estudio del VILI tiene gran interés clínico y biológico de acuerdo a dos criterios: (i) es un modelo de DPA, y se asocia con cambios fisiopatológicos e histológicos indistinguibles del DPA asociado a otros factores de riesgo (e.g., sepsis); (ii) es muy posible que pacientes sometidos a VM se encuentren en riesgo de sufrir (o sufran de hecho) daño en la función pulmonar relacionado con la VM (aun cuando se utilice un V_T bajo). En efecto, debido a la heterogeneidad del daño pulmonar en el DPA, es posible que, aun con el uso de V_T bajos y sin exceder la PIP (medida en el tubo endotraqueal) recomendada, existan áreas del pulmón sometidas a presiones alveolares elevadas. El estudio del VILI resulta, pues, de interés, como modelo de DPA, y como condición que *per se* puede estar implicada en el desarrollo o empeoramiento de la función pulmonar en pacientes sometidos a VM (81, 82).

El modelo de VILI ha aportado una información muy valiosa sobre los efectos del V_T sobre los cambios en la función y en la histología pulmonares. El uso de V_T elevado y PEEP=0 se asocia con hemorragia alveolar, formación de membranas hialinas, infiltración neutrofílica, disminución de la *compliance* y alteraciones en el intercambio gaseoso. Existe sinergismo cuando se combinan dos insultos, como el uso de V_T elevado y la administración de LPS. Otras intervenciones aumentan la susceptibilidad al daño inducido

por la VM, como son el lavado alveolar (para eliminar el surfactante pulmonar), o la administración de ácido clorhídrico por vía intratraqueal (140-142). Por ello, se distingue entre modelos de VILI en pulmón previamente sano y modelo de VILI en pulmón que previamente ha recibido otro insulto adicional, conocido como modelo de doble daño.

De especial interés por su relevancia clínica es el modelo experimental de DPA inducido por LPS y VM de forma conjunta. En efecto, la situación clínica consiste con frecuencia en la administración de VM a pacientes ingresados en la UCI con el diagnóstico de sepsis. Es posible que la VM *per se* en estos casos no cause daño (como se puede razonar en base a la experiencia de enfermos sin patología sistémica que son sometidos a una intervención quirúrgica y VM); que la sepsis se asocie *per se* con un cierto grado de disfunción pulmonar; y, finalmente, que la aplicación combinada de ambos insultos (sepsis y VM) origine un daño pulmonar significativo. De la misma forma, el modelo animal que se ha conseguido consiste en la administración de una dosis de LPS y de VM, que no producen efecto sobre la función pulmonar cuando se administran de forma independiente, pero que administradas de forma conjunta se asocian con disfunción pulmonar (143-145).

De entre los diferentes modelos de DPA (*vide supra*) el modelo de VILI tiene dos características: (i) es el único modelo basado en la administración de una intervención que es un “tratamiento”; (ii) es el modelo de DPA más utilizado en la investigación publicada. En las publicaciones de los últimos 5 años, la frecuencia de utilización de los diferentes modelos fue: VILI, 30%; administración de LPS, 19%; administración de bacterias vivas, 16%; hiperoxia, 12%; administración de bleomicina, 10%; administración de ácido oleico, 5%; LPC, 4%; instilación de ácido, 3% (146).

4.2. VILI en diferentes sistemas biológicos

Para cada uno de los insultos detallados anteriormente (LPS, sepsis, VM, etc.), el modelo de estudio puede ser (i) *in vivo* (el insulto se administra al animal) o *ex vivo* (el insulto se administra al órgano tras ser aislado); (ii) basado en el órgano o basado en la célula (*in vitro*). En efecto, se puede someter a una estrategia ventilatoria nociva al animal entero o

al pulmón aislado, o aplicar a un cultivo de células alveolares un estiramiento cíclico, remediando los cambios físicos que sufren las células en el pulmón sometido a V_T elevado *in vivo*.

Los métodos ***in vivo*** son más fisiológicamente relevantes y son muy apropiados para testar la eficacia de intervenciones con carácter terapéutico. Por ejemplo, estudios sobre la respuesta inmune innata han mostrado que el sistema inmune no sólo es activado por la presencia de productos bacterianos sino también por productos endógenos de los tejidos dañados y de la inflamación, en ausencia de productos microbianos en el tejido (128, 147). También se ha demostrado en estos modelos que el sistema inmune innato y el estiramiento mecánico de las células tienen importantes interacciones en adultos que atenúan el desarrollo de DPA. Estas interacciones parecen adquiridas con la edad y son menos pronunciadas en animales jóvenes (148).

Los métodos ***in vitro*** son una interesante alternativa a los métodos clásicos *in vivo* para la evaluación de las características biológicas y del comportamiento individual de determinadas células o vías metabólicas. Ese enfoque es apropiado para disecar mecanismos de daño celular o de activación de ciertas vías de señalización inter e intracelular, pues excluyen el efecto de la interacción con otros órganos. Por ejemplo, el papel de la apoptosis en la patogénesis del SDRA se puede estudiar de forma detallada en un modelo en el cual células alveolares son sometidas a un estiramiento cíclico (149). Por su propia naturaleza los modelos *in vitro* son una simplificación de una realidad compleja, y la información proporcionada ha de ser validada en modelos *in vivo* más fisiológicamente relevantes, donde tiene lugar la interacción con otros órganos o sistemas.

Los modelos ***ex vivo*** se utilizan para aislar mecanismos de cambio en la función celular o del órgano, o de activación/inhibición de vías de señalización inter e intracelulares, en condiciones en las que el órgano y su respuesta al insulto no se ven influenciadas por complejas interacciones con el resto del sistema.

4.3. Modelos de DPA inducido *ex vivo* por la ventilación mecánica

Los modelos de pulmones perfundidos *ex vivo* fueron diseñados en un principio con el propósito de transplantar pulmones a pacientes con daño pulmonar terminal. La preservación del órgano para su trasplante es de vital importancia, ya que permite el mantenimiento de la viabilidad durante periodos cada vez más largos. Para el estudio de estos procedimientos es deseable el uso de experimentos con especies animales pequeñas, lo cual resulta más simple y rentable. El modelo de perfusión pulmonar actual ha sido comercializado bajo el nombre de *IL-2 - Isolated Perfused Rat o bien Guinea Pig Lung System* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Germany).

El uso del modelo *ex vivo* se caracteriza por su reproducibilidad, fiabilidad, y bajo coste, e incluye estudios de preservación pulmonar y evaluaciones fisiológicas para trasplantes, estudios de función pulmonar y de intercambio gaseoso en modelos de DPA, evaluación funcional en modelos de enfermedad obstructiva y vascular (e.g. enfisema, hipertensión pulmonar), análisis de los efectos no pulmonares en enfermedades metabólicas y endocrinas, evaluación de la absorción y efectos de drogas y agentes inhalados, valoración del transporte de gases, y estudios de modos de VM alternativos (e.g., ventilación líquida con perfluorocarbonos) (76, 150-152). Por otro lado, el sistema permite mediciones más rigurosas y un mayor control de las variables hemodinámicas que el modelo en animal intacto.

Es importante destacar que ningún enfoque (*in vivo*, *ex vivo*) es mejor que otro, independientemente de otras consideraciones. Cada enfoque y modelo puede ser el indicado, dependiendo de la pregunta de investigación que se formula.

En nuestro caso, el diseño de un modelo de VILI *ex vivo* es un paso esencial en el desarrollo de la investigación en VILI por nuestro grupo. En efecto, el modelo de VILI *in vivo* e *in vitro* han sido desarrollados por nuestro equipo y han originado interesantes descubrimientos en esta área que han originado cuestiones abordadas en el modelo *ex vivo*.

En este contexto, nuestro grupo ha utilizado un modelo previo de VILI *in vivo* en ratas sanas o sépticas sometidas a V_T altos en el que se exploraron los mecanismos responsables del daño a nivel pulmonar y sistémico. El modelo se caracterizó por la presencia de membranas hialinas en el pulmón, disfunción en el intercambio gaseoso, inflamación pulmonar, aumento de la PIP y disminución de la *compliance* dinámica del sistema respiratorio. Pero los efectos de la ventilación mecánica **parecen no estar limitados al daño pulmonar**, pues se observaron profundos cambios sistémicos manifestados como hipotensión, aumento de la respuesta inflamatoria sistémica, acidosis láctica y daño hepático (10, 74, 111, 148).

Utilizando este mismo modelo *in vivo* fuimos pioneros en demostrar que la VM con V_T altos está asociada con **disfunción vascular *in vitro***. Tanto a nivel macro como microvascular se demostraron defectos en la relajación (curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de acetilcolina) y en la contracción (curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de norepinefrina) de vasos aislados, indicando una disminución de la reactividad a agentes vasoactivos (74, 111). Por tanto, en efecto, la VM lesiva no sólo produce patología a nivel pulmonar sino que genera alteraciones a distancia (74, 111, 123).

En este contexto, coincidiendo con nuestro resultados anteriores (74, 111, 115), hemos demostrado en un modelo *in vivo* que la VM lesiva produce disfunción respiratoria y vascular, acompañada de inflamación sistémica y pulmonar. Sin embargo, en los animales supervivientes al insulto, estos cambios se normalizan a las 24-72 h del insulto, mientras que otros (acidosis, edema pulmonar), persisten durante el periodo de observación. Al inhibir la respuesta inflamatoria de manera general administrando dexametasona observamos que no sólo el daño pulmonar sino además la **disfunción sistémica** eran atenuadas en los animales sometidos a 35 mL/kg (115).

Así mismo hemos demostrado que la administración de inhibidores de la enzima **ciclooxigenasa** previene el daño pulmonar y sistémico inducido por volúmenes corrientes altos, reduciendo el aumento de la permeabilidad a nivel pulmonar y vascular (153).

Finalmente, en colaboración con el laboratorio de la Prof. C. Casals (Dept. de Bioquímica, Universidad Complutense de Madrid) hemos demostrado en nuestro modelo de VILI un aumento de la concentración de proteínas carboniladas (indicando aumento el estrés

oxidativo, como aspecto del estrés nitrooxidativo) en el LBA en ratas sometidas a VILI. Este hallazgo se acompaña de cambios en la bioquímica del surfactante (disminución de la concentración de fosfolípidos en la fracción activa -agregados grandes- del surfactante y aumento de la concentración en la fracción inactiva -agregados pequeños-), un aumento de la ratio agregados pequeños/agregados grandes, peroxidación lipídica de los agregados grandes, disminución del contenido de la proteína B, C y A del surfactante (por Western Blot), y empeoramiento de las propiedades biofísicas del surfactante (empeoramiento de la adsorción interfacial de agregados grandes) (datos sin publicar).

Nuestro grupo también ha demostrado la presencia de nitración de proteínas en tejido pulmonar de ratas sometidas a VILI, y ha observado la mejoría de la disfunción pulmonar y cardiovascular asociada al VILI tras tratamiento con MnTMPyP (un catalista de la descomposición de peroxinitrito, la principal especie nitrante en condiciones de inflamación), y 3AB (un inhibidor de la PARP, enzima activado por el peroxinitrito) revirtiendo los cambios en la reactividad vascular, indicando un papel del estrés nitrooxidativo en la disfunción vascular asociada al VILI (102, 130).

Asimismo, hemos desarrollado un **modelo celular de DPA** en el cual células alveolares humanas son sometidas a estiramiento cíclico durante 24 h. En este modelo hemos demostrado que se induce aumento del estrés oxidativo en células A549, documentado por liberación de aniones superóxido, disminución de la actividad superóxido dismutasa y aumento en las concentraciones de 8-isoprostano. Todos estos cambios fueron atenuados por el tratamiento con células madre de origen adiposo humano, lo que sugiere un efecto anti-oxidante de las células madre que protege de la lesión por estiramiento cíclico en células alveolares humanos (154).

Por todo lo investigado por nuestro grupo previamente y planteándose nuevas hipótesis, en nuestro **modelo ex vivo** se analizó el papel del estrés nitrooxidativo en el desarrollo del VILI, parte del cual es el contenido de la presente memoria.

Es importante destacar que en los modelos *in vivo* la aplicación de V_T elevados se asocia necesariamente con cambios cíclicos de la presión intratorácica que condicionan cambios en las condiciones de carga del corazón, e.g., una disminución de la precarga. Es, pues, posible que los cambios observados en la inflamación sistémica durante la aplicación de V_T elevados (74, 102, 129, 155) se deban a la hipotensión consecuencia de la

disminución de la precarga y secundariamente a la hipoperfusión, inflamación y disfunción en los órganos, más que a una inflamación generada en el pulmón.

Para resolver este paradigma, en el presente proyecto se pretende demostrar que el pulmón genera inflamación en las condiciones de la preparación *ex vivo*, es decir, sin el efecto confusor de la disminución de la precarga y la hipotensión e hipoperfusión tisular consiguiente. En este contexto, ha resultado de extraordinario interés el desarrollo del presente modelo de VILI *ex vivo*, sometiendo a VM con V_T elevado a una preparación aislada de corazón-pulmón, cuya descripción es el objeto de la presente tesis.

4.4. Disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica

Independientemente de la gravedad del fallo respiratorio, la principal causa de mortalidad en el SDRA es el shock y el fallo multiorgánico más que la hipoxemia, como ya comentamos anteriormente (1-4). Las estrategias de ventilación protectora producen una disminución de la mortalidad, pero este descenso de la mortalidad en pacientes ventilados con V_T bajo no se acompañaba de diferencias en el intercambio gaseoso respecto a los pacientes con V_T elevado, sino de una menor duración del shock y el daño multiorgánico (4).

En trabajos pioneros de nuestro grupo encontramos que la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la VM se caracteriza por hipotensión, hiperpermeabilidad microvascular y disminución de la respuesta *in vitro* a estímulos vasoconstrictores y vasodilatadores (74, 111, 115).

Se ha postulado que un aumento en el estrés oxidativo y nitrosativo, con la formación de ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS), está implicado en la disfunción vascular inducida por la VM con V_T elevado. En este sentido, en otros estudios nuestro equipo (102, 130) ha estudiado los mecanismos de la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la VM en un modelo murino. Se ventilaban ratas con V_T bajo (9 ml/kg con PEEP de 5 cmH₂O) o elevado (35 ml/kg sin PEEP) durante 60 minutos y posteriormente se estudió *ex vivo* la reactividad vascular en anillos de aorta obtenidos de

Introducción

los animales ventilados. Tras incubar los anillos con diferentes atrapadores de radicales libres del oxígeno y de nitrógeno, como la Zn-Mn superóxido dismutasa (SOD), el tempol y la Mn(III) tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP), se analizó la curva dosis-respuesta de relajación y contracción, a dosis crecientes de acetilcolina y norepinefrina, respectivamente. Los principales hallazgos fueron que la alteración en la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora inducida por la ventilación con V_T elevado se corrige mediante la administración de atrapadores de radicales superóxido y peroxinitrito (tempol y MnTMPyP). Por otro lado, anillos vasculares de animales ventilados con V_T elevado mostraron fluorescencia positiva para anión superóxido y peroxinitrito, lo que sugiere la importancia de estos radicales en la fisiopatología de la disfunción vascular inducida por la VM con V_T elevado.

En el presente proyecto se pretende demostrar que la VM con volumen corriente elevado induce lesión pulmonar y daño de órganos a distancia, en concreto disfunción vascular caracterizada por una alteración en la relajación y contracción vascular. Al tratarse de un modelo *ex vivo*, en el que se ventila y se perfunde el pulmón, incubando posteriormente las aortas de otros animales previamente sanos con el líquido de perfusión que ha circulado por el pulmón sometido a VM con V_T elevado, se demostraría que son los mediadores producidos por el pulmón, que pasan a la circulación sistémica, los responsables de las alteraciones vasculares.

Resumiendo la introducción de la presente tesis, el SDRA consiste en una alteración aguda y grave de la estructura y función pulmonares, secundaria a un daño inflamatorio agudo. Como resultado de la lesión epitelial y endotelial se produce edema intersticial y alveolar que, junto con la depleción del surfactante y formación de membranas hialinas (13), empeora las propiedades mecánicas del pulmón y dificulta el intercambio gaseoso.

El DPA/SDRA es prevalente en enfermos críticos. Su forma de presentación como complicación de otras entidades graves (sepsis, neumonía, traumatismos, etc.), así como la ausencia de un tratamiento eficaz, le confieren unas características peculiares, como son complejidad en el manejo, alta mortalidad y elevado consumo de recursos (98).

El principal tratamiento de estos pacientes es la VM. Aunque este tratamiento (la VM) resulta esencial para el soporte vital de los pacientes, es actualmente reconocido que

determinadas estrategias de VM pueden agravar e incluso producir DPA/SDRA (66). Estudios en animales han demostrado que el uso de V_T elevados produce estiramiento tisular, induciendo una respuesta inflamatoria por un mecanismo de mecano-transducción (80). Este fenómeno biológico consiste en el desarrollo de una respuesta inflamatoria pulmonar (biotrauma) y la liberación de mediadores inflamatorios desde el tejido pulmonar dañado (156). Este complejo proceso fisiopatológico conduce al desarrollo de DPA/DRA (130, 157). Las lesiones pulmonares observadas en el VILI son indistinguibles de aquellas que sufren los pacientes de SDRA.

El pulmón dañado por la inflamación tisular característica del VILI inicia o contribuye a mantener la respuesta inflamatoria sistémica, liberando mediadores inflamatorios a la circulación que pueden inducir disfunción multiorgánica. Este hecho explicaría porqué la mayoría de los pacientes con DPA/SDRA no fallecen en situación de hipoxemia refractaria (2, 3), sino en situación de disfunción multiorgánica (1).

A pesar de los cambios observados en la práctica clínica como resultado de la investigación desarrollada en las últimas décadas, cuya consecuencia ha sido una reducción de los volúmenes tidal utilizados en la VM en pacientes con SDRA, nuestro grupo ha demostrado recientemente que el desenlace clínico de los pacientes sometidos a VM no ha mejorado significativamente (35). La VM además se puede asociar en pacientes con DPA/SDRA, aun cuando se utilicen V_T bajos, con daño pulmonar debido a la heterogeneidad de la presión en vía aérea en los pulmones de estos pacientes.

Por lo tanto, el estudio de los mecanismos responsables del DPA/SDRA sigue siendo uno de los objetivos prioritarios para nuestro grupo de investigación pues el mecanismo fundamental por el que se inicia y propaga el daño pulmonar aún no ha sido desvelado completamente.

Estudios en humanos nos han permitido conocer información descriptiva. Sin embargo, no es con frecuencia factible probar en humanos las hipótesis planteadas debido a la dificultad del diseño experimental en general en humanos. Los modelos animales nos proporcionan, pues, un medio para evaluar hipótesis sobre la patogénesis, la fisiopatología y el efecto de tratamientos innovadores, directamente y de forma simple y rápida en organismos complejos y en sistemas vivos intactos.

Introducción

El diseño de un modelo de VILI *ex vivo* es un paso esencial en el desarrollo de la investigación en VILI por nuestro grupo. En efecto, el modelo de VILI *in vivo* e *in vitro* ha originado interesantes descubrimientos en esta área, necesarios para el planteamiento de cuestiones abordadas por nuestro modelo *ex vivo*, como son los efectos de la ventilación mecánica sobre órganos no pulmonares, específicamente sobre la función vascular; el descubrimiento de biomarcadores de DPA; o el papel del estrés nitro-oxidativo en la disfunción pulmonar inducida por la ventilación mecánica.

Es pues, pertinente, el desarrollo de un modelo *ex vivo* que reproduzca la condición clínica del VILI y permita estudiar los mecanismos de daño y disfunción del pulmón y otros órganos en el contexto de la ventilación mecánica.

La finalidad última de la investigación con modelos experimentales (y, por tanto, la del presente proyecto) es mejorar la supervivencia de enfermos críticos que presentan daño pulmonar agudo o riesgo de desarrollarlo, muchos de ellos sometidos a VM.

Hipótesis y Objetivos

1. HIPÓTESIS

- El pulmón aislado sufre una lesión aguda inducida por ciertas estrategias ventilatorias.
- El estiramiento tisular inducido por la ventilación mecánica se asocia con una respuesta inflamatoria.
- La composición del líquido de perfusión determina la respuesta pulmonar al insulto mecánico.
- El efluente del pulmón ventilado induce disfunción en otros órganos.

2. OBJETIVOS

- Diseñar un modelo de daño pulmonar agudo en un sistema de ventilación de pulmón aislado.
- Demostrar que el estiramiento pulmonar se asocia con una respuesta local inflamatoria.
- Describir el efecto de la composición del líquido de perfusión (con o sin sangre autóloga) sobre la respuesta inflamatoria pulmonar.
- Demostrar que el efluente del pulmón ventilado *ex vivo* induce disfunción vascular *in vitro*.

Material y Métodos

1. METODOLOGÍA

1.1. Tipo de Estudio

Se trata de un estudio prospectivo observacional y de intervención de naturaleza experimental que fue realizado en un modelo murino *ex vivo* de ventilación mecánica.

1.2. Sujetos de Estudio

Se emplearon 56 ratas macho Sprague-Dawley (SD) de 325-375 gramos de peso, lo que corresponde al peso de adultos jóvenes. Los animales procedían de cría propia del animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe (Madrid) y fueron estabulados con estricto control de la temperatura (20-22°C), humedad relativa 40-60%, ciclo luz/oscuridad 12 h/12 h, con acceso a comida y agua *ad libitum*, y bajo control sanitario.

Todos los experimentos se realizaron en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe.

1.3. Preparación, Anestesia y Traqueostomía

Los animales fueron extraídos de la jaula el día del experimento, recibiendo inmediatamente inducción anestésica mediante la administración de un bolo intraperitoneal (i.p.) de ketamina (50 mg/kg), diazepam (5 mg/kg) y fentanilo (0.01 mg/ml), siendo a continuación pesados y rasurados, y posicionados en decúbito supino sobre una placa quirúrgica. Mediante incisión vertical en la región cervical ventral, se localiza y se aísla la tráquea. Se realiza una traqueotomía en el segmento medio de la tráquea, la cual es canalizada con un angiocatéter Abocath 14G que se conecta con un adaptador al ventilador mecánico (*vide infra*) (158) (Fig. 4 y 5).

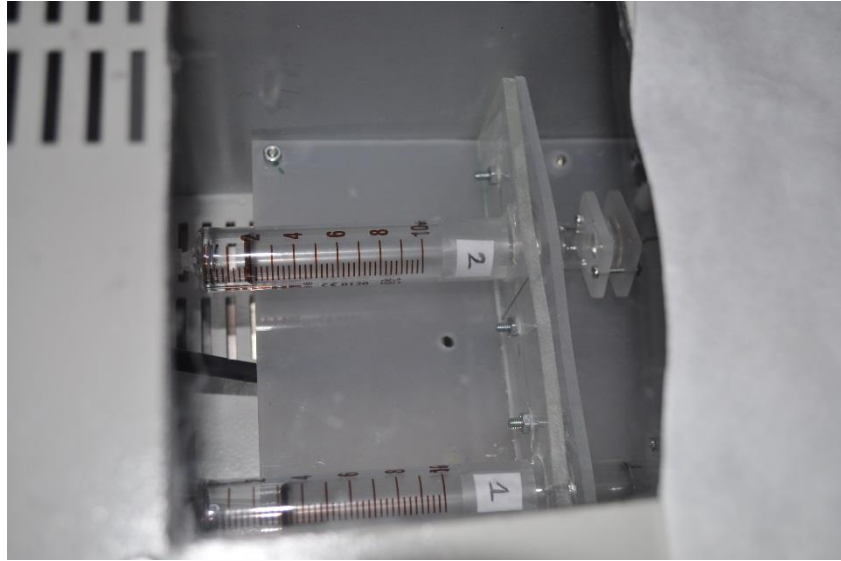


Figura 4. Detalle del ventilador (158).

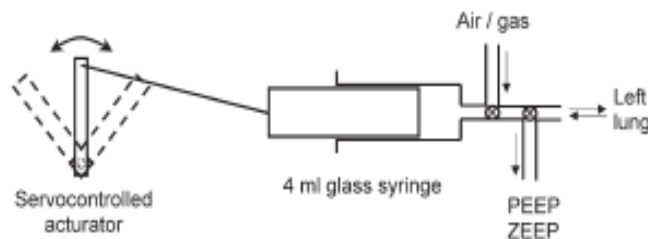


Figura 5. Diagrama del ventilador (159).

Posteriormente, se canaliza la arteria carótida para la administración de heparina y para exanguinación.

Para la cateterización de la arteria se separan los músculos laterales del cuello hasta visualizar aislar de tejido circundante la arteria carótida mediante la ayuda de pinzas pequeñas, y se pasan dos fragmentos de seda 4/0, deslizando unas pinzas pequeñas curvas por debajo de la arteria, y aislando un fragmento y cortando el flujo de sangre.

A continuación, se anuda uno de ellos en dirección cefálica y se sujeta con el mosquito tirando para mantener la arteria en tensión (Fig. 6). Se presenta el nudo dejándolo preparado para cuando se cánula la arteria. Manteniendo el flujo cortado con las pinzas, se hace una incisión transversal en la arteria con cuidado de mantener la continuidad. Con la ayuda de pinzas finas, se dilata la arteria y se introduce el catéter relleno de suero

heparinizado, conectándolo a la llave cerrada. Una vez en el interior vascular, se fija el catéter con la seda, haciendo un nudo sin cortar el flujo. Se mantiene hasta este momento el flujo de la arteria cortado con las pinzas para evitar pérdida de sangre. Una vez anudado, se retiran las pinzas y se hace avanzar el catéter ligeramente hacia el interior de la arteria, estrechando algo más el nudo y haciendo otro nudo para mejor fijación del catéter. Posteriormente, se lava la arteria con suero heparinizado. Para más seguridad, se fija de nuevo el catéter anudando con el fragmento proximal de seda (Fig. 7).

Los animales recibieron heparina (100 UI/100 gr de peso) a través de la la arteria carótida izquierda y posteriormente exanguinados, conservando la sangre para su posterior utilización en los casos que procedía (*vide infra*).



Figura 6. Aislamiento de la arteria carótida y de la tráquea.



Figura 7. Canulación de la arteria carótida y traqueostomía.

1.4. Laparotomía, Toracotomía y Montaje en la Cámara Pulmonar

Seguidamente, se realiza una laparotomía media, y se retiran lateralmente las asas intestinales, cubriéndolas en caso necesario con gasas estériles empapadas en suero fisiológico. Posteriormente, se practica una toracotomía traccionando los hemitórax con retractores a la placa metálica quirúrgica para a continuación conectar el ventilador mecánico (V_T 6 mL/kg, PEEP 5 cmH₂O).

Una vez se accede al corazón, se cateterizan la arteria pulmonar y la aurícula izquierda utilizando unas cánulas conectadas al circuito de perfusión. Para ello, se realizan incisiones en el tronco de la arteria pulmonar (para acceder a la arteria pulmonar), y en el

ventrículo izquierdo (para acceder a la aurícula), se insertan las cánulas y se aseguran con seda 4/0 (Fig. 8).

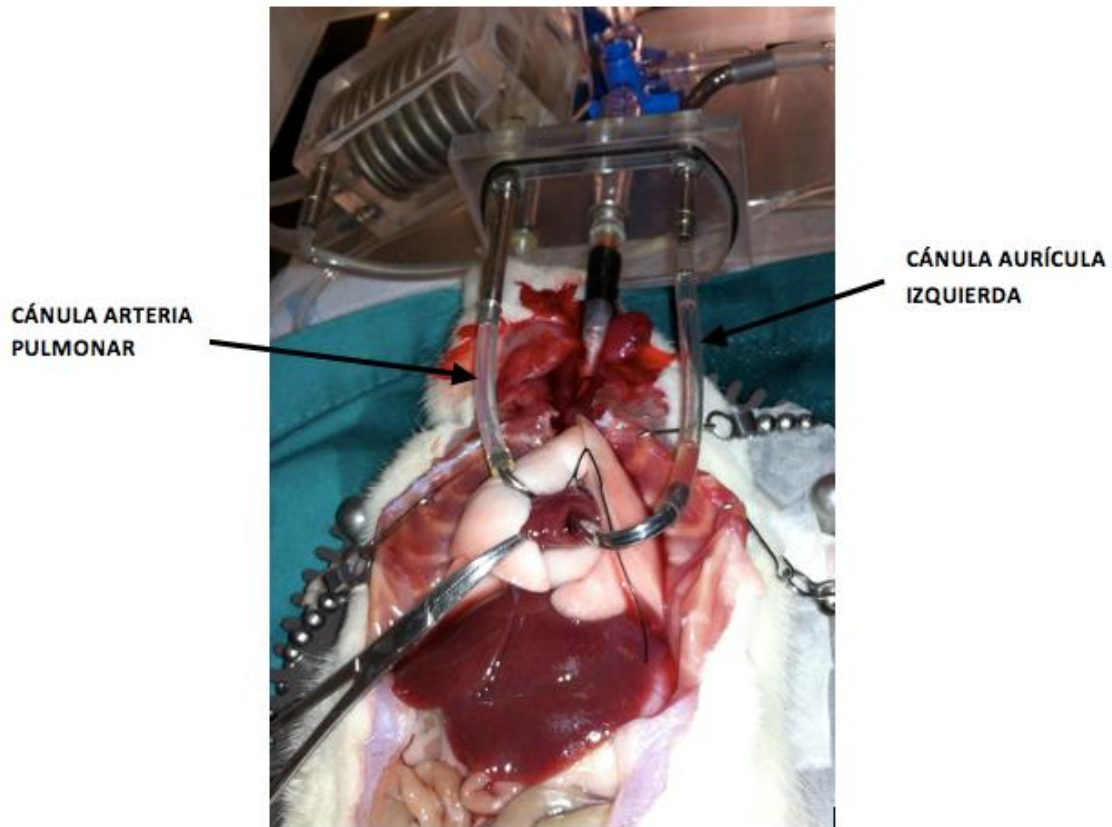


Figura 8. Canulación de la arteria pulmonar y la aurícula izquierda.

Los pulmones son perfundidos con 40 ml de una solución Krebs-Henseleit cuya composición es: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 2.5 mM, NaHCO_3 13.2 mM, BSA 2%, glucosa 0.1%, Hepes 0.3%

Ambas cánulas se conectan a un circuito de circulación (Ultraterm 200, J.P. Selecta, Barcelona) a través del cual los pulmones son perfundidos con la solución de Krebs modificada con 4% de albúmina mantenida a 37° C y burbujeada con 5% CO_2 , 20% O_2 con balance de N_2 . Se añade de *ad libitum* Antifoam SE-15 (ref A8582 de Sigma), una sustancia inerte que evita la formación de espuma, ya que la solución está continuamente burbujeada.

La velocidad de perfusión es de 4 ml/min. Seguidamente se extraen los pulmones y el corazón en bloque, y la pieza corazón-pulmón es montada en la cámara pulmonar, donde se mantiene a una temperatura de 37°C con humedad. La extracción de los pulmones requiere un cuidado extremo para evitar cualquier contacto que pueda dañar el tejido (Fig. 9).



Figura 9. Aspecto final del pulmón ventilado y perfundido.

Posteriormente se mide y se monitoriza de forma continua la presión en la arteria pulmonar (PAP) a través de un catéter conectado a la cánula de la arteria pulmonar y un transductor de presión (Hewlett Packard, Model 66S, Geneva, Switzerland). De igual forma se registra la PEEP y PIP a través de otro transductor de presión conectado a la salida del tubo endotraqueal (Hewlett Packard, Model 66S, Geneva, Switzerland) a través

de la traqueostomía. Se registran estas medidas cada 30 min, desde T=0 hasta los 150 min.

1.5. Protocolo de Ventilación Mecánica

Utilizamos un modelo de ventilación mecánica *ex vivo* en ratas a las que se extraen en bloque los pulmones y el corazón (Fig. 11). Los pulmones son ventilados con (i) una estrategia ventilatoria nociva que consiste en la administración de volúmenes tidal (V_T) elevados, sin presión positiva al final de la espiración (positive endexpiratory pressure, PEEP); o bien (ii) una estrategia consistente en la administración de un V_T bajo con PEEP (grupo control).

Se utiliza un ventilador volumétrico de pistón de diseño local, amablemente cedido por los Drs. Farré y Navajas de la Universidad de Barcelona (158) (*vide infra*). Este ventilador mecánico fue diseñado en el Departamento de Biofísica y Bioingeniería de la Universidad de Barcelona (Fig.4). Se basa en un activador servocontrolado (HS-325HB, Hitec, Powdy, Calif., USA) que impulsa electrónicamente el pistón de una jeringa de vidrio convencional (5 ml, BD, Franklin Lakes, N.J., USA). La salida de la jeringa se conecta a diferentes válvulas que permiten suministrar al pulmón un volumen corriente determinado (Fig. 5). Es importante señalar que la conexión de la línea de espiración a un tubo cuyo extremo se encuentra sumergido en agua que permite la administración de PEEP.

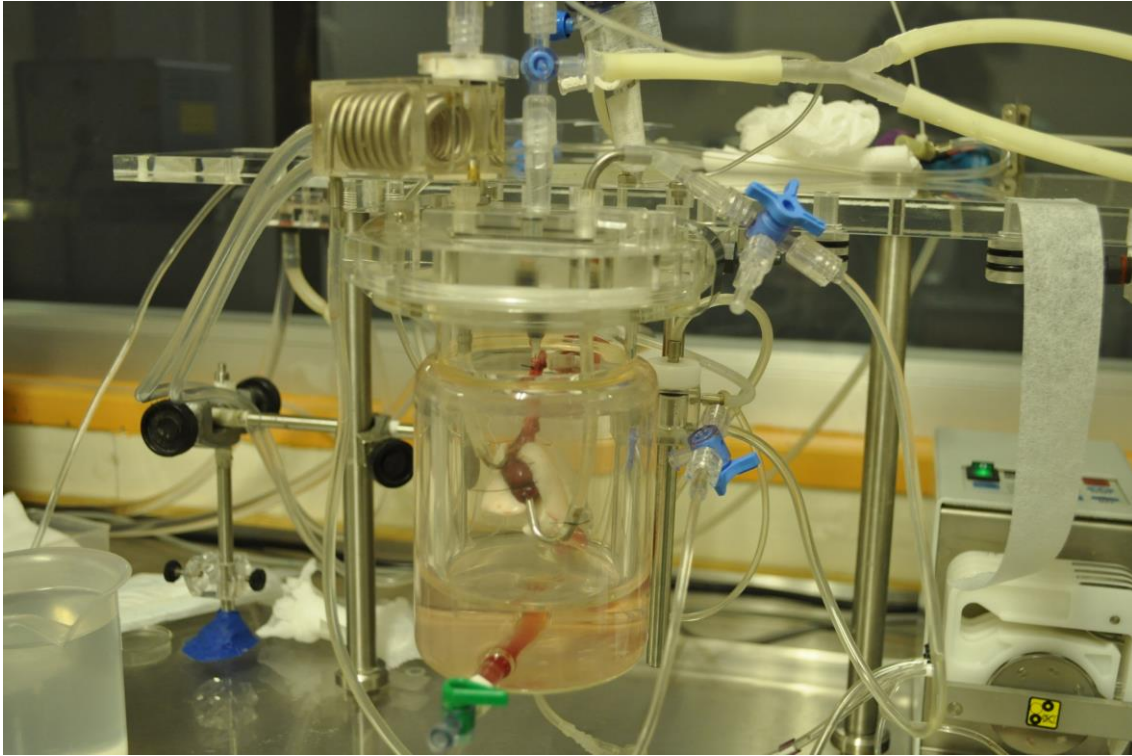


Figura 10. Modelo de ventilación mecánica *ex vivo*. Se aprecia la cámara de ventilación que contiene el bloque corazón-pulmón aislado.

Para el diseño del modelo se compararon cambios en una serie de variables (*vide infra*) en el grupo sometido a V_T bajo y el grupo sometido a V_T elevado.

Se desecharon las preparaciones que presentaban laceraciones en la superficie de los pulmones, PIP mayores de 20 cm H₂O o PAP iguales o mayores de 14 mm Hg.

Durante un tiempo de estabilización de 30 min las preparaciones fueron ventiladas como el grupo control ($V_T = 6 \text{ mL/kg} + \text{PEEP} = +5 \text{ cm H}_2\text{O}$). Tras el periodo de estabilización de 30 min, las preparaciones fueron aleatorizadas para ser ventiladas con uno de los siguientes protocolos:

1. V_T bajo con PEEP ($V_T=6 \text{ mL/kg}$, $\text{PEEP}=5 \text{ cmH}_2\text{O}$) ($n=7$)
2. V_T alto sin PEEP ($V_T=25 \text{ mL/kg}$, $\text{PEEP}=0 \text{ cmH}_2\text{O}$) ($n=7$)

El líquido de perfusión fue solución de Krebs (KS).

De esta forma estudiamos los efectos que produce el uso de la ventilación mecánica con parámetros lesivos (V_T elevado y ausencia de PEEP).

El comienzo del período de ventilación mecánica siguiendo la estrategia asignada por aleatorización a cada preparación se considera $T=0$ min. El momento de mediciones realizadas justo antes del inicio del período de ventilación mecánica según el protocolo asignado se indican como $T=-5$ min.

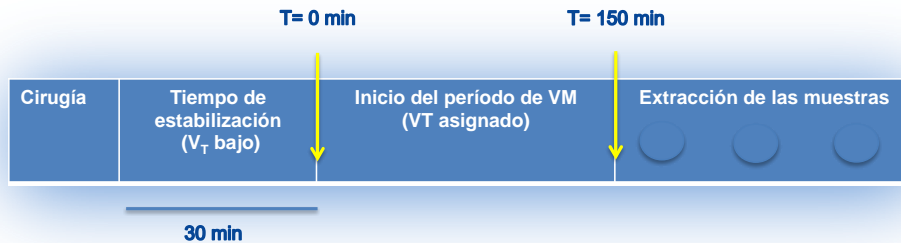


Figura 11. Diagrama del protocolo experimental. Se simboliza con flecha amarilla los puntos de extracción de muestras a $T=0$ y $T=150$.

Para describir el efecto de la composición del líquido de perfusión (con y sin elementos sanguíneos) se estudiaron dos grupos adicionales que fueron sometidos al mismo protocolo de ventilación mecánica que el descrito anteriormente, y cuyo líquido de perfusión fue solución de Krebs a la que se añaden elementos sanguíneos (sangre autóloga del mismo animal del cual proceden los pulmones en estudio) (KS+S). Los grupos fueron:

1. V_T bajo con PEEP ($V_T=6$ mL/kg, PEEP=5 cmH₂O) perfundidos con sangre autóloga ($n=7$)
2. V_T alto sin PEEP ($V_T=25$ mL/kg, PEEP=0 cmH₂O) perfundidos con sangre autóloga ($n=7$)

La sangre se obtuvo mediante canalización de la arteria carótida izquierda y obtención de 8-10 ml. Se añadió 8 ml de sangre al líquido de perfusión, extrayendo simultáneamente una cantidad equivalente de KS con el objeto de mantener constante el volumen total del líquido de perfusión, en unos 40 ml.

De esta forma estudiamos los efectos de la sangre en el daño inducido por la ventilación mecánica con parámetros lesivos.

En los 4 grupos de estudio se ventiló con aire ambiente, con frecuencia respiratoria de 60 rpm y una relación I:E de 1:1.

Se midió la PAP a través de un transductor conectado a la rama arterial, que fue monitorizada de forma continua. De igual forma se midió la PIP a través de otro transductor conectado a la salida del tubo endotraqueal.

La duración de la ventilación fue de 150 min (Fig. 12).

En los grupos ventilados con elevado V_T elevado se aumentó el espacio muerto para mantener una PCO_2 en el líquido de perfusión similar a la del grupo control (ya calculado en experimentos previos).

1.6. Elementos del Sistema de Ventilación *Ex Vivo*

El modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido *ex vivo* consta de varios elementos (Fig. 10):

- Un respirador **(1)** (158) conectado con la cánula de traqueostomía. Entre la conexión a la traqueostomía y las tubuladuras se coloca un sensor de presión **(2)** que monitoriza la presión en la vía aérea (PIP).
- Un calentador **(3)** (Ultraterm®), que mantiene la temperatura y humedad necesarias en la cámara pulmonar y el líquido de perfusión.
- Una bala de gases **(4)**, que contiene un 5% de CO_2 y 20% de O_2 , con balance de nitrógeno, para burbujear el líquido de perfusión para mantener el pH adecuado.
- Una bomba de perfusión **(5)** (ISMATEC®), para recircular el líquido de perfusión.
- Plataforma con un reservorio que contiene el líquido de perfusión **(6)**.
- Cámara pulmonar **(7)** donde se sitúa el bloque pulmón-corazón. En la parte superior tiene una conexión a la traqueostomía y el respirador. En el interior tiene 2 tubos, uno proximal, que se conecta a la cánula de la arteria pulmonar **(8)**, y uno distal, que se conecta a la cánula de la aurícula izquierda **(9)**.
- Monitor **(10)** (Hewlett Packard® Modelo 66S), en el que se registra la presión de la arteria pulmonar **(11)**.

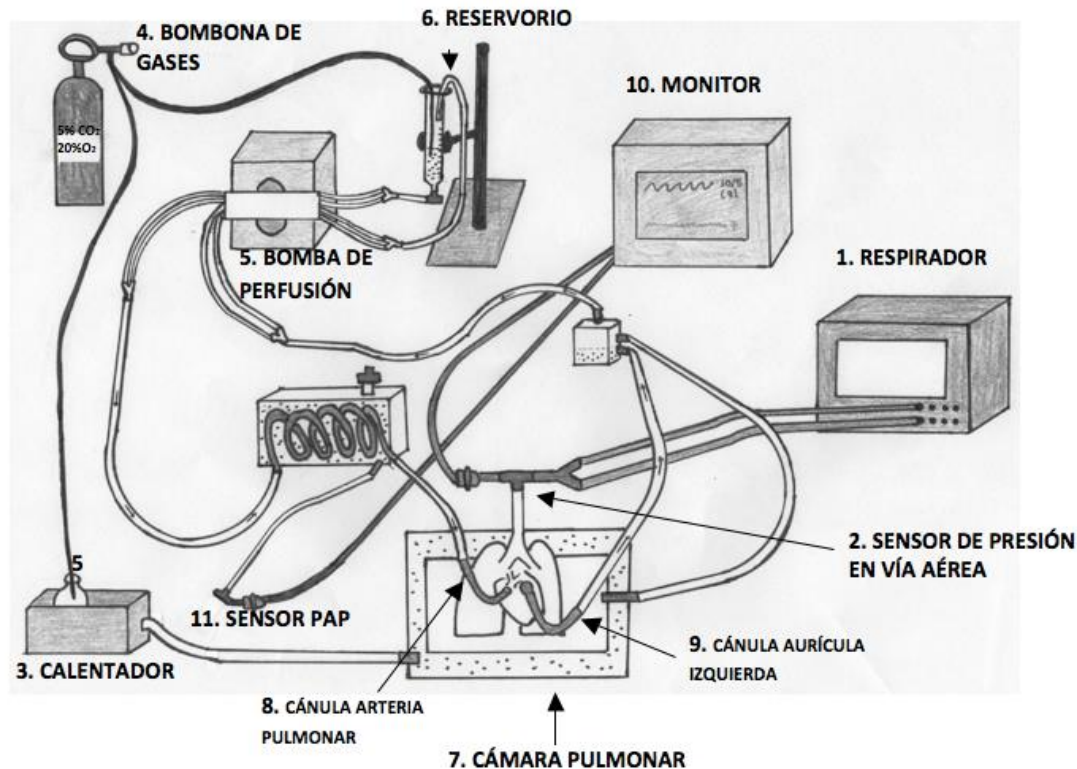


Figura 12. Esquema general del sistema de ventilación y perfusión de pulmón *ex vivo*, con cada uno de sus componentes.

1.7. Obtención de Muestras

Al principio (T=-5 min) y al final (T=150 min) del período de ventilación mecánica se extrajo líquido de perfusión del reservorio para el análisis de los gases (pH, PCO₂, PO₂, CO₃H) y determinación de la concentración de lactato.

Al final del periodo de ventilación mecánica:

1. Se realiza un LBA con 10 ml de suero salino 0,9% con el fin de obtener fluido para estudio bioquímico (valoración de los enzimas indicativos de daño pulmonar, como son ALT, AST, LDH, y determinación de la concentración de proteínas totales).
2. Se conservaron fragmentos del pulmón derecho a -80°C para el estudio de la respuesta inflamatoria.
3. El pulmón izquierdo se expandió mediante la administración endobronquial de 5 ml de formol, para conservación posterior en formaldehído al 10% (7-9 ml) para (i) análisis

histológico; y (ii) análisis del estrés nitro-oxidativo por inmunofluorescencia. Los protocolos se describen a continuación.

2. VARIABLES DE ESTUDIO

2.1. Valoración del daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica

2.1.1. Propiedades mecánicas: presión en la vía aérea

Las propiedades mecánicas del pulmón se evaluaron mediante la medición de la presión pico en la vía aérea (PIP) a través de un transductor conectado a la salida del tubo endotraqueal. Las mediciones se realizaron a T=-5 min, T=0 min, y cada 30 min hasta T=150 min. Se midió así mismo la presión arterial pulmonar (PAP).

2.1.2. Estructura del pulmón: estudio histológico

Se procedió a la tinción hematoxilina-eosina según protocolo habitual, para observación a microscopía óptica. Se evaluó el grado de daño histológico de acuerdo con scores previamente publicados (17-19, 74, 115) (*vide infra*).

2.1.3. Permeabilidad alveolo-capilar

La permeabilidad alveolo-capilar se valoró mediante la determinación de la concentración de proteínas en el fluido de LBA, así como del cociente en la actividad de diferentes enzimas (*vide infra*) entre el fluido del LBA y el líquido de perfusión (Integra 700, Roche Diagnostics, Basilea Suiza).

2.1.4. Daño celular pulmonar

Se midió la actividad de enzimas indicativos de daño pulmonar (ALT, AST y LDH) tanto en el fluido del LBA como en el líquido de perfusión (Integra 700, Roche Diagnostics, Basilea Suiza).

2.1.5. Cambios en el equilibrio ácido-base

Se determinaron los gases y el equilibrio ácido-base (pH, PCO₂, PO₂, CO₃H), así como la concentración de lactato en el líquido de perfusión (Gem Premier 3000, IL Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain).

2.1.6. Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria se midió en muestras de tejido pulmonar mediante (i) la determinación de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias; (ii) la medición de la expresión génica de esas proteínas.

2.1.7. Concentración de citoquinas

Se determinó la concentración de las citoquinas IL-6, IL-10, MIP-2, IL1 β mediante la técnica Luminex y MCP1 mediante la técnica Elisa.

2.1.8. Expresión génica

Se cuantificó en el tejido pulmonar la expresión relativa de diferentes genes (IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-2, TNF α) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Se procedió al aislamiento del ARN total y posteriormente se obtuvo el ADNc (ADN complementario) mediante la reacción de la transcriptasa inversa (RT) según especificaciones del fabricante.

2.1.9. Estrés nitrosativo

El estrés nitrosativo se midió mediante (i) la determinación de proteína nitradas (Western blot); (ii) la detección de la presencia de residuos de nitro-tirosina.

2.1.10. Estrés oxidativo

Se analizó la presencia de radicales libres del oxígeno por fluorescencia para la detección de los aniones superóxido (fluorescencia a dihidroetidio).

2.1.11. Efecto del daño pulmonar en la función de otros órganos

Se incubaron en un baño de órganos anillos de aorta torácica normales (procedentes de ratas adultas macho SD sanas) con el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados en diferentes condiciones (V_T elevado o V_T bajo, perfundidos con KS o con KS+S).

En un bioensayo se midió en un miógrafo la tensión isométrica generada por los vasos durante la administración de dosis crecientes de noradrenalina (función contráctil) o acetilcolina (función endotelial).

3. TÉCNICAS DE ESTUDIO

3.1. Histología pulmonar

Se tomaron tres fragmentos del pulmón izquierdo para su análisis histológico: una procedente de una sección de corte a nivel del hilio pulmonar, otra inmediatamente por encima y otra inmediatamente por debajo. Cada una de ellas fue cortada en secciones de 5 µm y teñida con hematoxilina-eosina.

Se analizaron diez campos de cada sección mediante microscopio óptico usando lentes de 40x.

Para cuantificar el daño pulmonar se empleó un índice basado en los trabajos de Muscedere y Copland (18, 19) que ha sido utilizado en trabajos previos de nuestro grupo (17, 74, 115). Este índice se basa en el hallazgo de infiltrado inflamatorio, necrosis de neumocitos tipo I y formación de membranas hialinas. En cada campo se asigna una puntuación: 0 (no existen membranas); 1 (se observa una membrana); 2 (se observan dos membranas); 3 (se observan más de dos membranas). La media de los valores asignados los diferentes campos es la puntuación final.

Este análisis fue realizado de manera ciega por dos anatomopatólogos del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Getafe.

3.2. Concentración de citoquinas

En primer lugar se realizó una homogeneización del tejido pulmonar utilizando el mismo sistema que para la expresión génica mediante un buffer de lisis proteico T-Per (Pierce, Illinois, USA). Se cuantificó la proteína total de cada muestra mediante el método del BCA (ácido bicistrónico) (Pierce, Illinois, USA).

Las citoquinas IL-6, IL-10, MIP-2, IL1β, se determinaron mediante la tecnología Luminex según recomendaciones del fabricante (RyD Systems, MN, USA).

La citoquina MCP-1 se determinó mediante ELISA (Quantikine, RyD Systems, MN, USA) según las recomendaciones del fabricante.

Los resultados de la concentración de citoquinas fueron normalizados de acuerdo con los niveles de proteína total de cada una de las muestras.

3.3. Expresión génica

Se utilizó un sistema de PCR a tiempo real para la detección de ARNm de diferentes genes. En primer lugar, se realizó el triturado y homogeneización del tejido pulmonar con el buffer de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Germany) y la utilización del sistema MagNA Lyser Green Beads (Roche, Barcelona, España). El extracto tisular se procesó para la extracción del ARN total utilizando el kit RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden Germany) según las recomendaciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN se determinaron mediante espectrofotometría a A260 y el cociente 260/A280 respectivamente en un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE). Posteriormente se realizó la reacción de la transcripción reversa de 1 ug de ARN total con el kit high-Capacity cDNA reverse transcriptional Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) según las recomendaciones del fabricante. La PCR en tiempo real (*vide infra*) se llevó a cabo en una Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Se utilizaron ensayos TaqMan específicos para IL-6, IL10, MIP-2, TNF α , MCP-1, (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los ensayos de expresión génica TaqMan assays están diseñados para la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, mediante la utilización de primers y sonda TaqMan marcada con el fluoróforo FAM para el gen a estudiar. El ensayo estudia esta sonda fluorogénica que consiste en un oligonucleótido que lleva unido una molécula reportera (FAM) en el extremo 5' y un quencher en el 3'. Cada muestra se realizó por triplicado y como gen normalizador se utilizó la expresión del 18S ribosomal. Los valores CT (*Cycle threshold*) se determinaron utilizando el software del equipo (SDS software of the 7500 Fast System (Versión 2.0.1) y los niveles relativos de expresión se obtuvieron mediante el método del " $\Delta\Delta C_t$ " (159).

3.4. Estrés nitrosativo: Western blot de 3-nitrotirosina

3.4.1. Extractos proteicos

Para extraer el contenido proteico del tejido pulmonar se obtiene un fragmento de tejido pulmonar de 50 mg el cual se disgrega manualmente con un bisturí, al que se le añade 400 µl de buffer de extracción de proteínas T-PER (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) junto con el cóctel de inhibidores de proteínas Compete Mini (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) y se introduce en tubos MAgNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). A continuación, los tubos se centrifugan a 7000 r.p.m durante 30 segundos repitiéndolo tres veces en el MagNA Lyser (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Los extractos proteicos obtenidos se recogen y se congelan a -80°C hasta su utilización. La cantidad de proteína de estos extractos se cuantifica mediante el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

3.4.2. Western Blot

La técnica de Western Blot se utilizó para cuantificar la cantidad de 3-nitrotirosina. Tras la obtención de los extractos proteicos pulmonares y la cuantificación de las proteínas, estos extractos se disolvieron en un tampón de carga que contenía Tris (25 mM), dodecilsulfato sódico (SDS 2%), glicerol (5%), β-mercaptoetanol (1%) y azul de bromofenol (0,025%). A continuación, se cargó una cantidad similar de proteínas pulmonares en cada carril, 10 µg, tras lo cual las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) a 180 V y 120 mA. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) de 45 mm de diámetro de poro durante 2 horas a 250 V y 340 mA.

Después de la transferencia de las membranas, éstas se bloquearon durante 2 horas y a temperatura ambiente en una solución de bloqueo que contenía Tris pH 7,5 (1 M), monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween 20) al 10%, cloruro sódico (3 M) y leche desnatada al 5 % para evitar uniones inespecíficas. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-3-nitrotirosina (dilución: 1/100; Chemicon International, USA) toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con una solución que contenía Tris pH 7,5, Tween 20 al 10% y cloruro sódico (3M), las membranas se

incubaron con un anticuerpo secundario a una dilución 1/10.000 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas resultantes se visualizaron mediante quimioluminiscencia tras incubar las membranas con la mezcla de reactivos comerciales SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) durante 5 minutos, tiempo tras el cual las membranas se analizaron en un aparato de toma de imágenes Multimage™ Light Cabinet Filter Positions y se analizó con el programa AlphaFaseFC (Fluor Chem) ambos de Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA, USA). El análisis densitométrico es representativo de la media de los resultados de varios individuos para cada grupo de tratamientos.

3.4.3. Inmunofluorescencia indirecta a 3-nitrotirosina

Las secciones de pulmón se desparafinaron mediante el paso por xilol, diferentes alcoholes y agua, tras lo cual se sumergieron en tampón citrato a pH=6 y mediante golpes de calor con microondas se produjo el desenmascaramiento de los epítopes.

Después se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% (BSA) y 0.1% de Tritón X-100 en PBS durante 2 horas 37°C; tras lo cual, las secciones se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (dilución: 1/100; Chemicon International, USA).

A continuación, las secciones se lavaron con PBS y 0.1 % Tritón X-100 y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 546 (dilución 1/250; Molecular Probes, Inc. USA) durante 45 minutos a 37°C. Además, las secciones se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol DAPI (300 nM) durante 5 minutos a 37 °C para marcar los núcleos celulares (el DAPI se intercala entre las bases del ADN produciendo fluorescencia azul). Después, se hicieron varios lavados con PBS y las secciones fueron montadas y visualizadas al microscopio de fluorescencia. La especificidad de la técnica de inmunofluorescencia fue evaluada por la supresión del anticuerpo primario.

3.4.4. Estrés oxidativo: fluorescencia a DHE

Las muestras de tejido pulmonar se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) (2 M, pH 7.36). A continuación, se parafinaron y se cortaron en secciones transversales de 8 mm los pulmones. Las secciones se desparafinaron mediante el paso

por xilol, diferentes alcoholes y agua. Las secciones fueron entonces incubadas 90 minutos a 37°C con la sonda fluorescente de dihidroetidio (DHE, 4 mmol/l; Calbiochem, Darmstadt, Alemania). En presencia de los aniones superóxido, el DHE es oxidado a etidio, el cual se intercala con el ADN, y produce una fluorescencia roja intensa. Además, las secciones fueron incubadas con 4',6-diamindino-2-fenilindol (DAPI) (300 nM) durante 5 minutos a 37°C. Finalmente, después de varios lavados en PBS con 0.1 % Tritón X-100, las secciones fueron montadas y visualizadas al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Japan).

3.4.5. Estudio de la función vascular

Con el fin de demostrar que el daño sistémico tiene como origen la lesión inflamatoria pulmonar, se comparó el efecto de ambas estrategias ventilatorias (V_T bajo y V_T elevado) sobre la función vascular. Para ello se realizó un bioensayo para demostrar que la liberación de sustancias desde los pulmones dañados induce daño en órganos a distancia, en concreto en el sistema vascular. Con ese fin, en un modelo de función vascular *in vitro* se incubaron anillos de aorta procedentes de ratas sanas con la solución de perfusión procedente de pulmones ventilados con V_T bajo o V_T elevado, y se estudió la respuesta de dichos anillos a la administración de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras.

En primer lugar se aplicó el protocolo de VM *ex vivo* descrito anteriormente en ratas macho SD, cuyos pulmones fueron ventilados con V_T bajo ($n=7$) o V_T alto ($n=7$). Al igual que en el objetivo 1 y 2, estas ratas fueron anestesiadas, exanguinadas, se les extrajo el bloque corazón-pulmón que posteriormente se montó en el sistema y se le conectó al ventilador con la estrategia ventilatoria correspondiente y fueron perfundidas durante 150 minutos. Tras la realización del experimento se recuperó el líquido de perfusión que posteriormente fue utilizado en el bioensayo.

Los anillos vasculares se obtuvieron de ratas normales de la misma procedencia que las ratas utilizadas para la extracción de la pieza corazón-pulmón y posterior ventilación *ex vivo*. De forma análoga, se procedió tras la anestesia a una toracotomía, y extracción de la aorta torácica. La estructura vascular se introduce en una placa Petri con solución Krebs-Henseleit a 4°C y se limpia del tejido conectivo adherido (Fig.13). Posteriormente

se corta en anillos de aproximadamente 5 mm de longitud que son montados en un baño de órganos para el estudio de la función vascular *ex vivo*.



Figura 13. Detalle de la limpieza y corte de la aorta torácica de la rata para la valoración de la función vascular *ex vivo*.

En cada experimento de función vascular *ex vivo* se testaron ocho anillos procedentes de la misma rata (Fig. 14):

- Dos anillos controles para el grupo procedente del experimento de ventilación mecánica (V_T bajo o elevado) durante 30 minutos (para comprobar el funcionamiento de cada arteria). Estos anillos control fueron incubados con líquido de perfusión no utilizado en el experimento y que, por tanto, que no ha pasado por el pulmón.
- Dos anillos problema incubados con el líquido de perfusión procedente del experimento de ventilación mecánica (V_T bajo o elevado) durante 30 minutos.

- Dos anillos controles para el grupo procedente del experimento de ventilación mecánica (V_T bajo o elevado) durante 60 minutos (para comprobar el funcionamiento de cada arteria). Estos anillos control fueron incubados con líquido de perfusión no utilizado en el experimento y que, por tanto, que no ha pasado por el pulmón.
- Dos anillos problema incubados con el líquido de perfusión procedente del experimento de ventilación mecánica (V_T bajo o elevado) durante 60 minutos.
- Este protocolo fue repetido, en aortas diferentes, y cada uno de los grupos V_T bajo o elevado se estudió o la vasodilatación o la vasoconstricción (*Vide infra*).

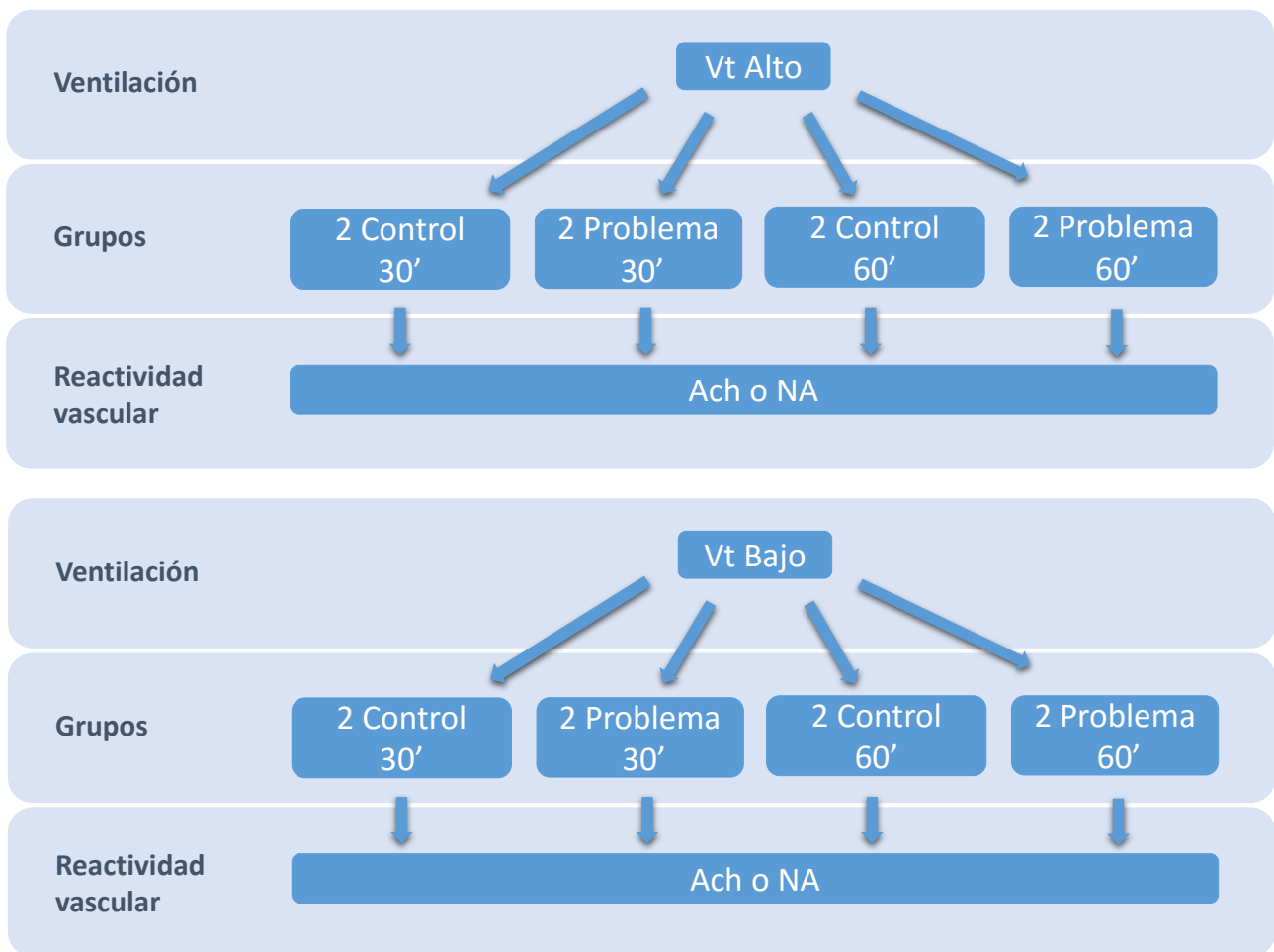


Figura 14. Esquema del protocolo del estudio de función vascular *in vitro*.

Los 8 anillos se montaron en 8 baños de órganos donde se mantuvieron a 37°C, burbujeados con O₂ al 95%, y CO₂ al 5%, para proporcionar un pH entre 7,3 y 7,4. Todos

los anillos fueron ubicados al azar en los baños y el técnico encargado de analizar las respuestas vasculares desconocía la estrategia ventilatoria utilizada en cada grupo.

Para evaluar la tensión isométrica, los anillos fueron montados en el baño de órganos entre dos soportes de alambre de acero inoxidable (Fig.15), uno de ellos fijo unido al baño de órganos y el otro conectado a un transductor de fuerza isométrica. La señal del transductor fue amplificada por un sistema BIOPAC (BIOPAC® Systems, Inc, Santa Bárbara, California) y registrada usando el software Acqknowledge® (Fig. 16). Se aplicó una tensión isométrica en cada anillo vascular de 1,5 g con el fin de calibrar el sistema y se estabilizaron durante 60 min. Posteriormente la integridad funcional de los vasos se evaluó exponiendo cada anillo a un pulso de potasio 75 mM durante 2 minutos. Posteriormente se lavaron las arterias cuatro veces con KS para eliminar el efecto producido por el K^+ y fueron dejadas en reposo hasta que volvieran a la línea base (30-60 minutos) antes de comenzar el experimento.

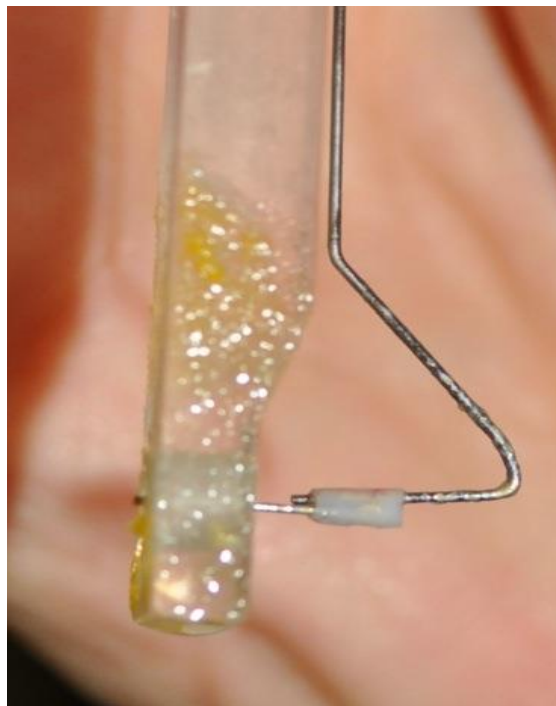


Figura 15. Detalle de un anillo montado en el baño de órganos. Se observa un anillo de aorta montado entre dos soportes de alambre de acero inoxidable.

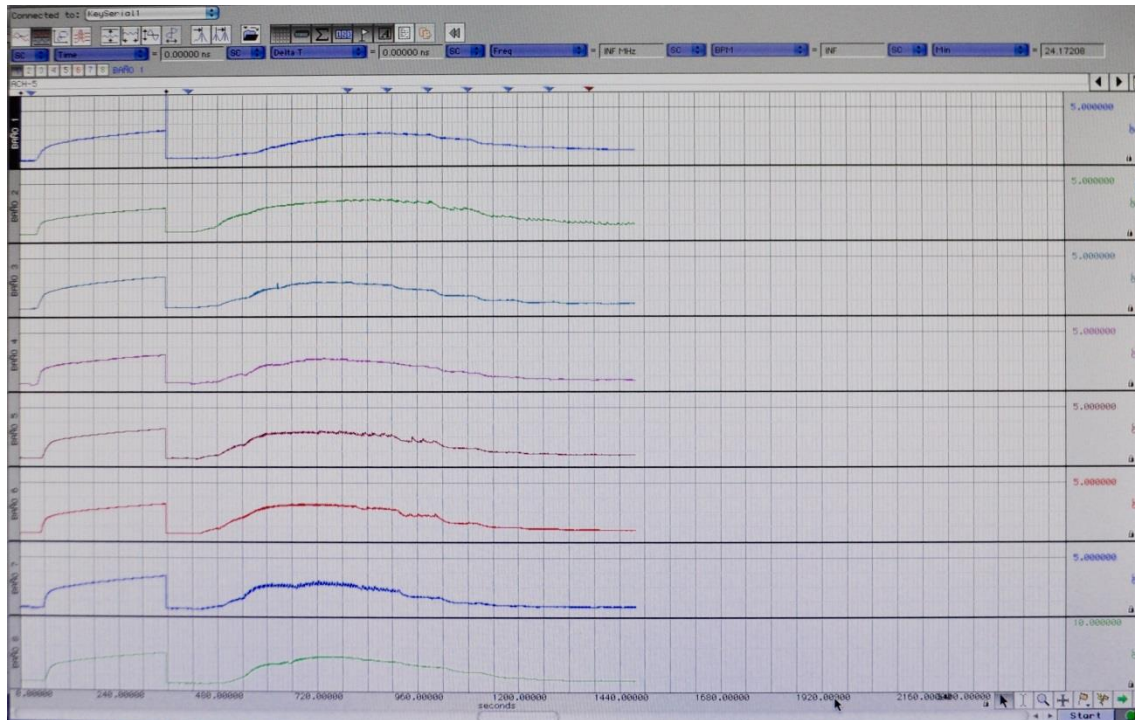


Figura 16. Detalle del registro Acqknowledge®.

Tras el periodo de lavado y una vez alcanzada la meseta, los anillos vasculares fueron incubados 30 minutos (n=3 pocillos) ó 60 minutos (n=3 pocillos) con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con V_T bajo o V_T elevado.

Pasados los 30 minutos o 60 minutos, se procedió a realizar las curvas de relajación o contracción (Fig. 17).

3.4.6. Estudio de la relajación

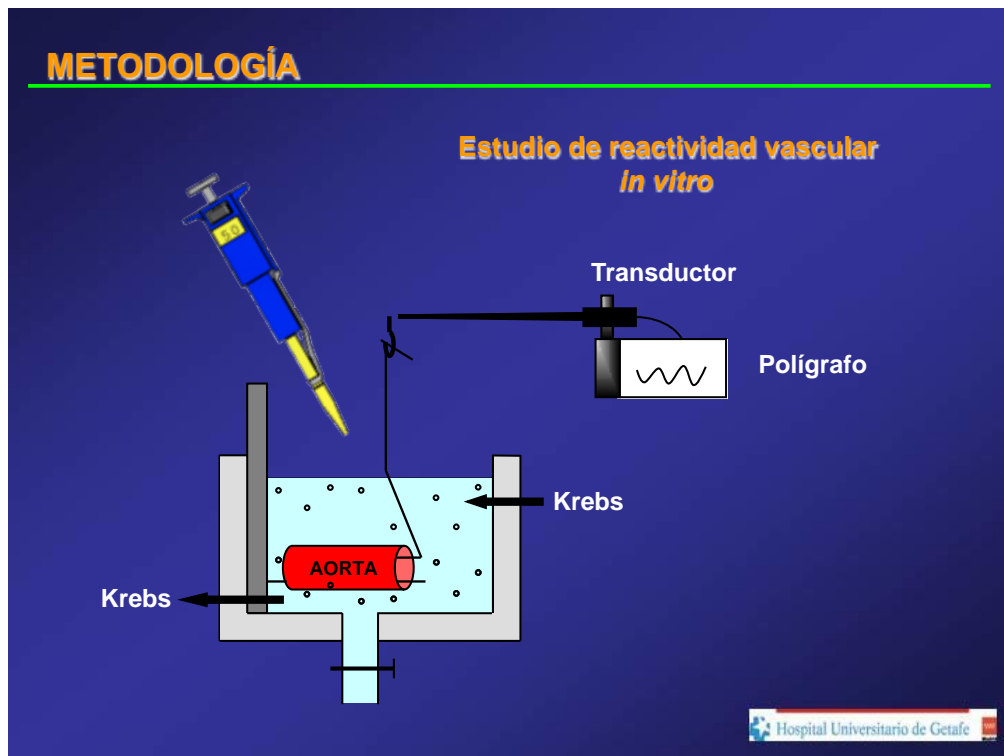
Se utilizó la acetilcolina (ACh) como vasodilatador, para estudiar la función endotelial de los vasos. Para ello, los anillos fueron contraídos previamente con noradrenalina (NA). Una vez estabilizada la contracción, se administró en el baño dosis crecientes de ACh (de 10^{-9} M a 10^{-5} M). Los datos se representan en una curva dosis-respuesta y se expresan como el porcentaje de contracción residual en relación a la contracción máxima alcanzada con NA.

3.4.7. Estudio de la contracción

Se utilizó la NA, un vasoconstrictor alfa adrenérgico, para el estudio de la función muscular de los vasos. Para ello, se administró en el baño concentraciones crecientes de NA (de 10^{-9} M a 10^{-5} M), obteniéndose una curva dosis-respuesta. Los datos se presentarán como el porcentaje de la contracción máxima alcanzada con el pulso de potasio.

Cada anillo fue usado únicamente una vez (una curva por anillo). La Ach y la NA fueron elegidas como sustancias vasoactivas, para testar, respectivamente, la función endotelial y la función vascular del músculo liso.

A.



B.



Figura 17. Representación esquemática del estudio de reactividad vascular *in vitro*. A)
Representación gráfica del baño de órganos para el estudio de la reactividad vascular *in vitro* en aorta.
B) Representación gráfica de las curvas dosis - respuesta a acetilcolina (Ach) y noradrenalina (NA)
representadas en los dos dibujos inferiores.

Las dosis y tiempos de incubación de estas drogas se eligieron basándose en estudios previos de sus efectos en diferentes modelos (160, 161).

Ach (Sigma, St. Louis, Mo) se disuelve en agua destilada y NA se disuelve en solución salina (NaCl 0.9% / ácido ascórbico, 0.01% wt/vol).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las medias fueron comparadas mediante el test de la *t* de Student, con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones en los casos en que está indicada. La respuesta vascular en las diferentes condiciones se comparó mediante un ANOVA para medidas repetidas y análisis multivariante para determinar la significación estadística de la diferencia entre los diferentes grupos.

En los casos en que la situación basal de una variable era muy diferente entre los grupos (e. g., la PIP, al aumentar el V_T , es muy diferente en los grupos sometidos a V_T bajo que V_T elevado), se comparó entre los diferentes grupos el delta (cambio) desde la situación basal ($T=0$ min) y la situación final ($T=150$ min).

Para una mejor comprensión se ha dividido el análisis en: (i) comparación de los grupos V_T bajo y V_T elevado (ambos perfundidos con KS), con el objeto de definir los efectos de la ventilación mecánica con V_T elevado; (ii) comparación de los 4 grupos (V_T bajo y V_T elevado, perfundidos con KS o con KS+S), con el objeto de demostrar el efecto de la composición del líquido de perfusión (KS *versus* KS+S) en los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado.

Se usó el paquete estadístico SPSS.15 para el análisis de los datos.

Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media.

En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Investigación del Hospital Universitario de Getafe.

Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo los principios del animal de laboratorio (2010/63/EU 22-09, RD 53/2013 BOE 1-02, Ley 32/2007 BOE 7-11, España) y las guías de nuestro centro, garantizando el confort de los animales durante todas las fases del experimento.

Se ha trabajado bajo la tutela de personal de laboratorio con acreditación C para el manejo de animales.

Este proyecto ha sido financiado por FIS.

Resultados

6. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO DEL PULMÓN AISLADO SE ASOCIA CON DAÑO PULMONAR AGUDO

En este apartado se analizó la respuesta de varios aspectos de la estructura y función pulmonares a la ventilación con V_T bajo ($V_T=6$ mL/kg + PEEP=5 cm H₂O) o V_T elevado ($V_T=25$ mL/kg + PEEP=0 cm H₂O).

6.1. Resumen de los resultados del Objetivo 1

Los resultados correspondientes al objetivo 1 indican que los pulmones sometidos a VM con parámetros lesivos desarrollaron a lo largo del experimento daño y disfunción pulmonares.

Los pulmones del grupo sometido a V_T elevado presentaron, en comparación con el grupo sometido a V_T bajo:

- Deterioro de la mecánica respiratoria, caracterizado por un aumento a lo largo del tiempo de la PIP.
- Formación de membranas hialinas (DAD), identificadas mediante observación microscópica.
- Aumento de la concentración de proteínas totales en el LBA.
- Aumento de la actividad de ALT, AST y LDH en LBA.

Estos cambios indican que la VM ex vivo utilizando V_T elevado induce tanto daño (deterioro de las propiedades mecánicas, cambios histológicos indicativos de DAD, daño celular) como disfunción pulmonar (hiperpermeabilidad alveolocapilar). Los cambios inducidos por la VM sugieren el desarrollo de edema pulmonar por hiperpermeabilidad, DAD y lesión celular.

6.2. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP

Con el fin de determinar las variaciones producidas en la mecánica pulmonar se analizaron los cambios en la PIP durante el tiempo de VM.

Los pulmones sometidos a V_T elevado presentaron, en comparación con el grupo V_T bajo, aumento de la PIP a lo largo del tiempo de observación de 2,5h (Fig 18A).

A tiempo basal ($T=-5$ min) ambos grupos mostraron el mismo valor de PIP, ya que fueron ventilados con la misma estrategia ventilatoria ($V_T=6$ mL/kg + PEEP=5 cmH₂O) antes del comienzo del período de VM con la estrategia asignada mediante aleatorización.

El aumento inicial de la PIP en $T=0$ min en el grupo sometido a V_T elevado se debe al cambio de V_T desde 6 ml/kg hasta 25 ml/kg en ese grupo (V_T elevado), mientras que el grupo sometido a V_T bajo continuó siendo ventilado con $V_T=6$ ml/kg, por lo que la PIP no cambió desde $T=-5$ min hasta $T=0$ min.

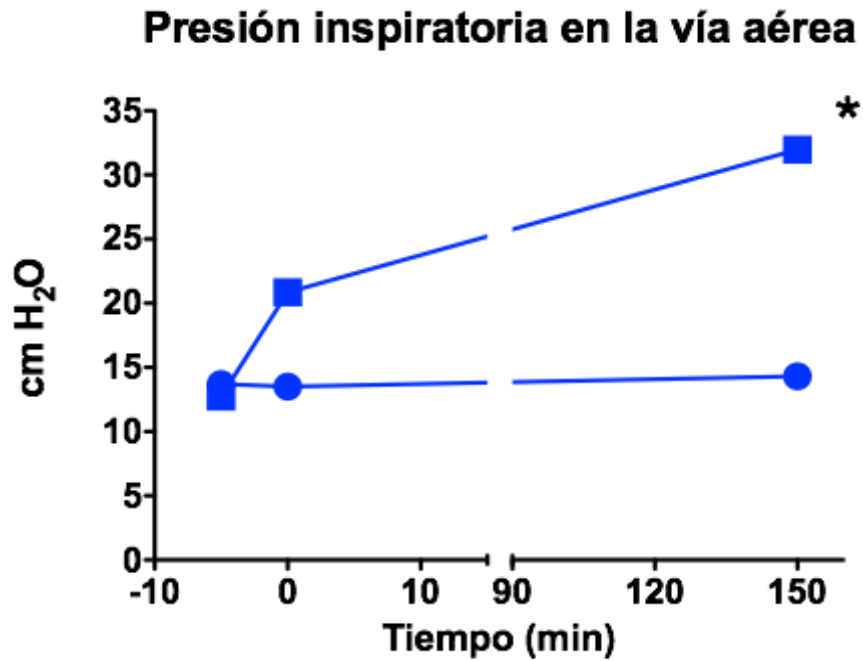
Manteniéndose esta maniobra de ventilación, los pulmones ventilados con V_T bajo mostraron a lo largo del experimento un valor de PIP similar al valor de $T=0$ min). Sin embargo, en los pulmones sometidos a una ventilación con V_T elevado se observó un aumento progresivo y significativo de la PIP ($p<0,0001$ para la comparación del cambio de PIP en el tiempo entre el grupo VT bajo y el grupo VT elevado, desde $T=0$ min hasta $T=150$ min).

Este cambio en la PIP asociado al uso de V_T elevado indica una alteración de las propiedades mecánicas del pulmón.

La PAP no cambió a lo largo del tiempo en ninguno de los grupos ($p=0,30$ para la comparación del cambio de la PAP en el grupo V_T bajo y en el grupo V_T elevado) (Fig. 18B).

Estos cambios en la PIP indican que la VM ex vivo utilizando V_T elevado induce un deterioro de las propiedades mecánicas del pulmón probablemente en el contexto de desarrollo de edema pulmonar.

A



B

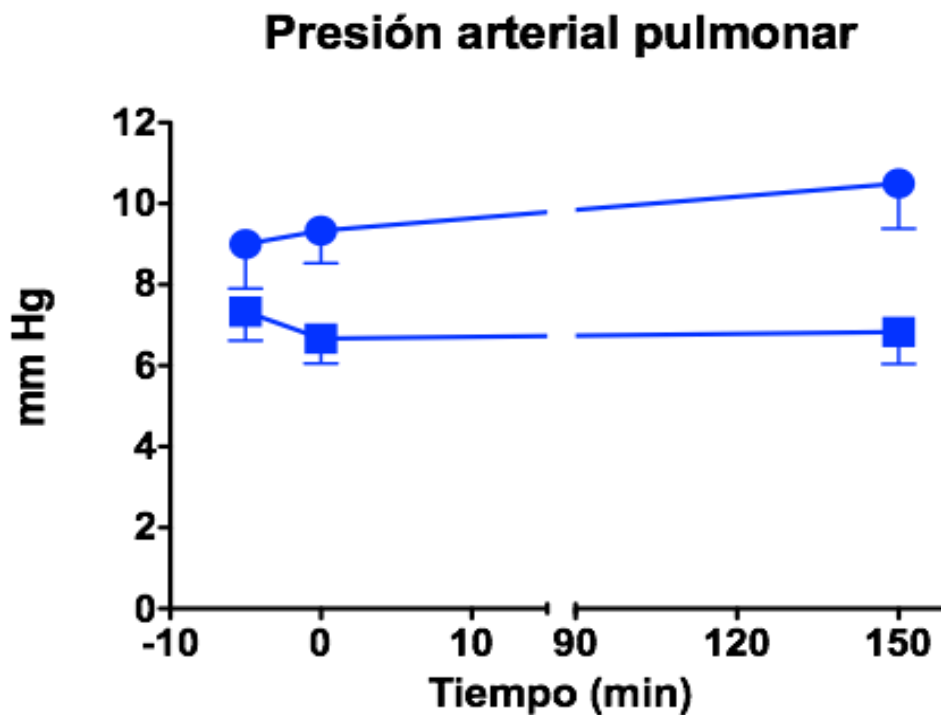


Figura 18. A) Cambios en la PIP inducidos por la VM. Evolución de la PIP T=-5 min hasta T=150 min en pulmones ventilados ex vivo con VT alto (cuadrados) o bajo (círculos). Los pulmones sometidos a VT elevado presentaron a lo largo del tiempo una elevación de la PIP, como manifestación de cambios en la estructura pulmonar y posiblemente formación de edema pulmonar. Los valores son media±EEM. Las barras de error no se visualizan porque quedan incluidos dentro del símbolo (*) $p < 0,05$ para la evolución en el tiempo desde T=0 min hasta T=150 min. **B) Ausencia de cambios en la PAP durante la VM.**

6.3. Estructura del pulmón: estudio histológico

Con el objeto de examinar los cambios estructurales inducidos por la VM se analizaron mediante microscopía óptica (MO) las alteraciones histológicas de pulmones sometidos a V_T bajo o V_T elevado, utilizando un *score* predefinido.

Los pulmones del grupo sometido a V_T elevado presentaron en el examen histológico, en comparación con el grupo sometido a V_T bajo, un mayor *score* de daño pulmonar tras 2,5h de VM ($p < 0,0001$) (Fig. 19, 20).

En el examen histológico se encontraron cambios indicativos de DAD (Fig. 20).

La VM utilizando V_T elevado induce, por tanto, cambios histológicos característicos de DAD (como son, p. ej., la formación de membranas hialinas).

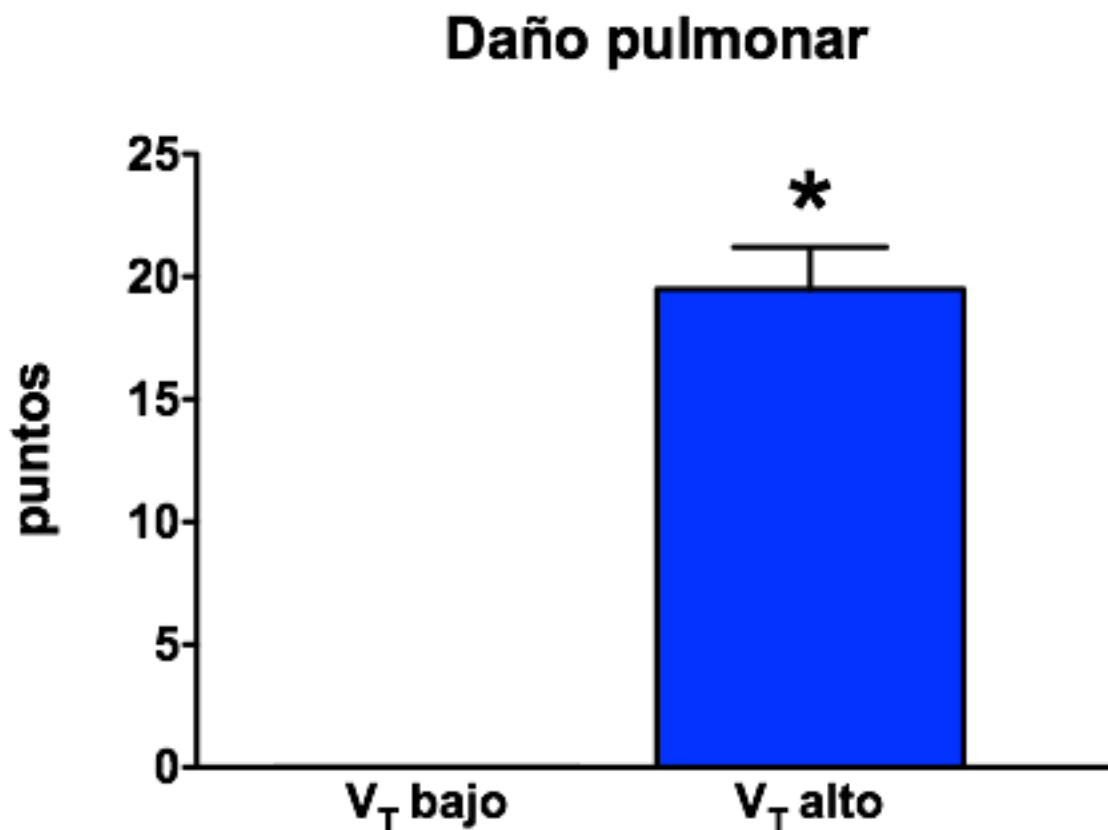


Figura 19. Daño pulmonar inducido por la VM. Efecto de VM con VT bajo y alto sobre el daño pulmonar valorado histológicamente por MO, de acuerdo con un *score* predefinido Muscedere y Copland (18, 19). Los pulmones sometidos a VT elevado presentaron una marcada elevación del *score* de daño pulmonar, mientras que los pulmones sometidos a VT bajo no presentaron daño histológico. Los valores son media \pm EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo.

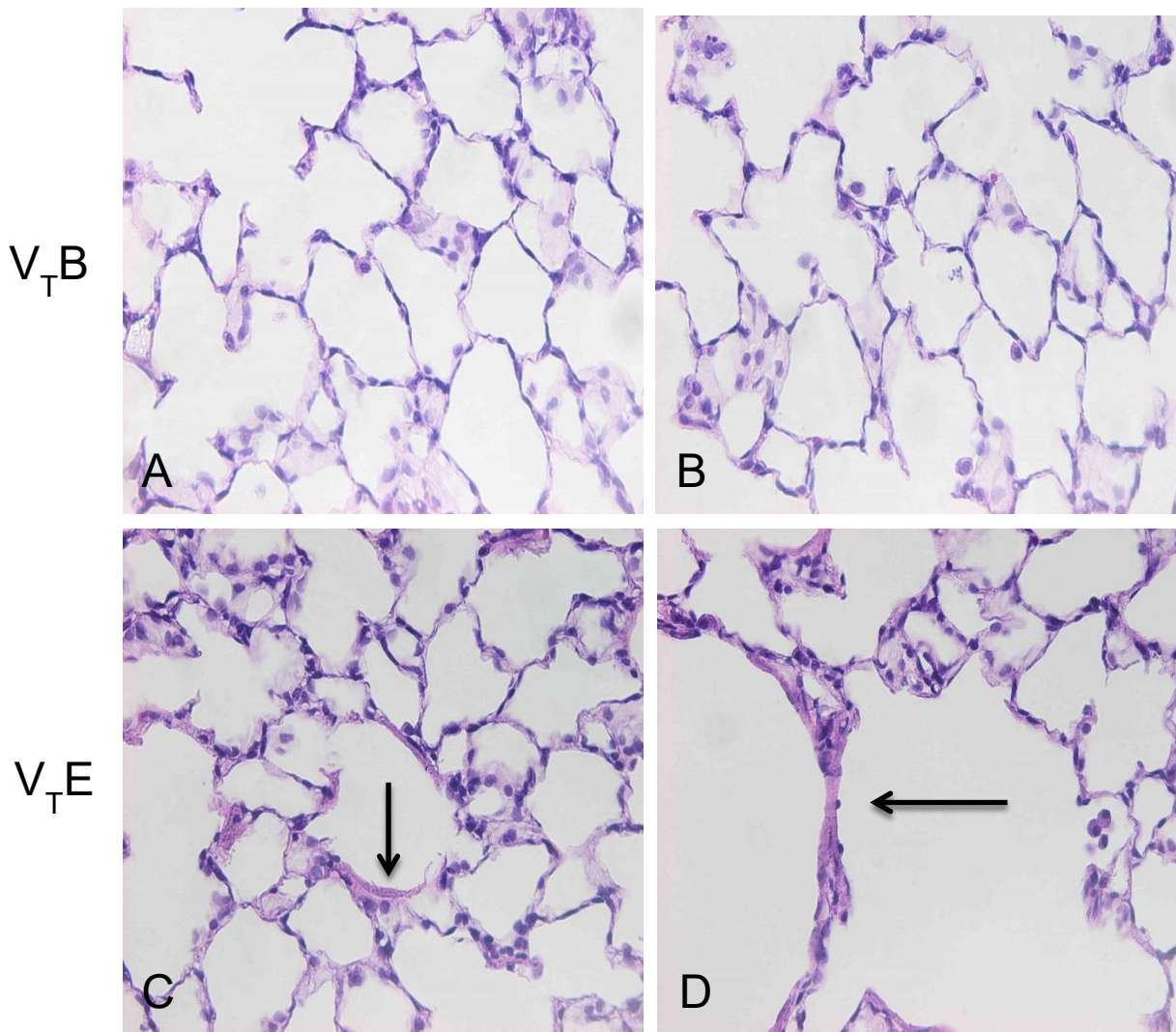


Figura 20. Cambios histológicos inducidos por la VM (HE, x20). La VM utilizando V_T elevado se asoció con cambios histológicos característicos de DAD. Se aprecia la presencia de membranas hialinas (flechas negras) en la muestra de tejido pulmonar procedente de casos representativos sometidos a V_T elevado (C, D), mientras que la apariencia microscópica de casos sometidos a V_T bajo fue normal (A, B).

6.4. Permeabilidad alveolo-capilar: concentración de proteínas totales en el LBA y en el líquido de perfusión

Con el fin de determinar si la VM con V_T elevado se asocia con un aumento de la permeabilidad alveolocapilar, se determinó la concentración de proteínas en el LBA y en el líquido de perfusión.

Los pulmones del grupo V_T elevado presentaron, en comparación con el grupo V_T bajo, un aumento de la concentración de proteínas en el LBA ($p=0,0005$) sin cambios en la concentración en el líquido de perfusión ($p=0.81$), tras 2,5h de VM (Fig. 21, 22).

Este aumento en la concentración de proteínas totales en el LBA asociado al uso de V_T elevado y no acompañado de un cambio paralelo en el líquido de perfusión sugiere, por tanto, una alteración de la permeabilidad alveolocapilar del pulmón sometido a VM con V_T elevado.

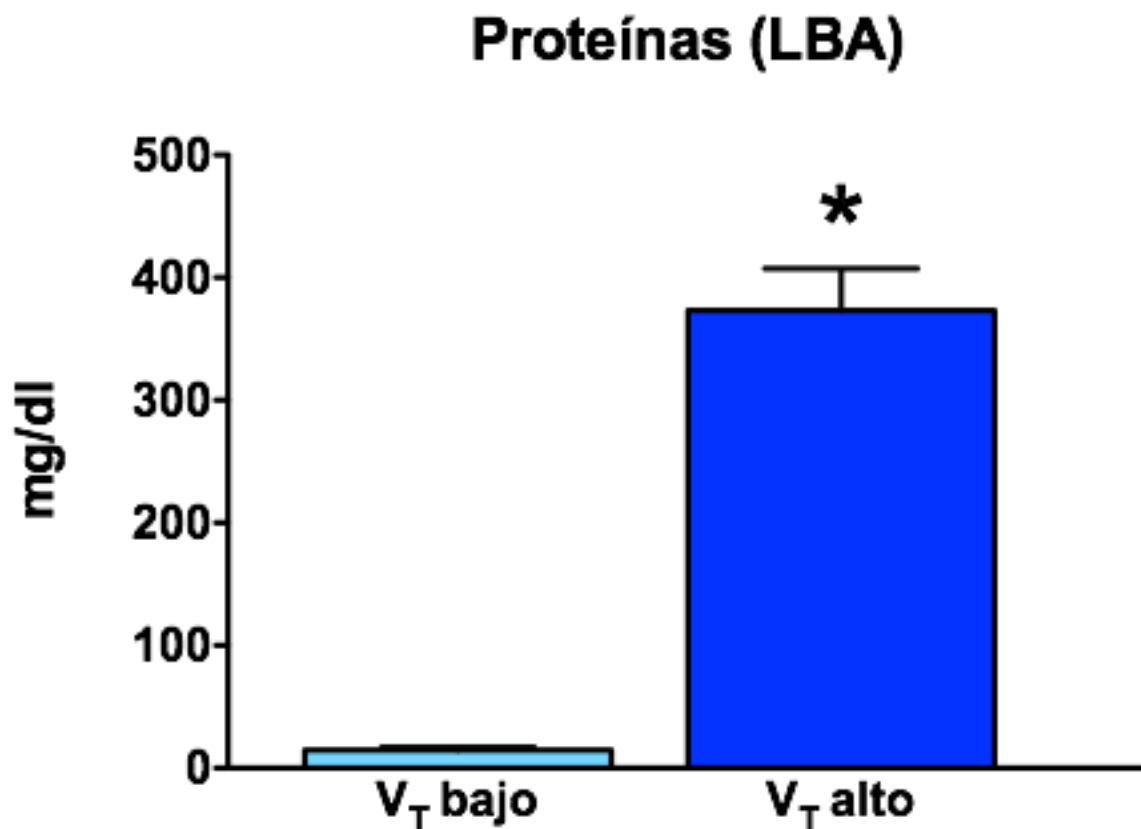


Figura 21. Concentración de proteínas en el LBA. Efecto de la VM sobre la permeabilidad alveolocapilar valorada mediante la determinación de la concentración de proteínas en el LBA. LBA, lavado broncoalveolar. Los valores son media \pm EEM. (*) $p<0,0$ versus V_T bajo.

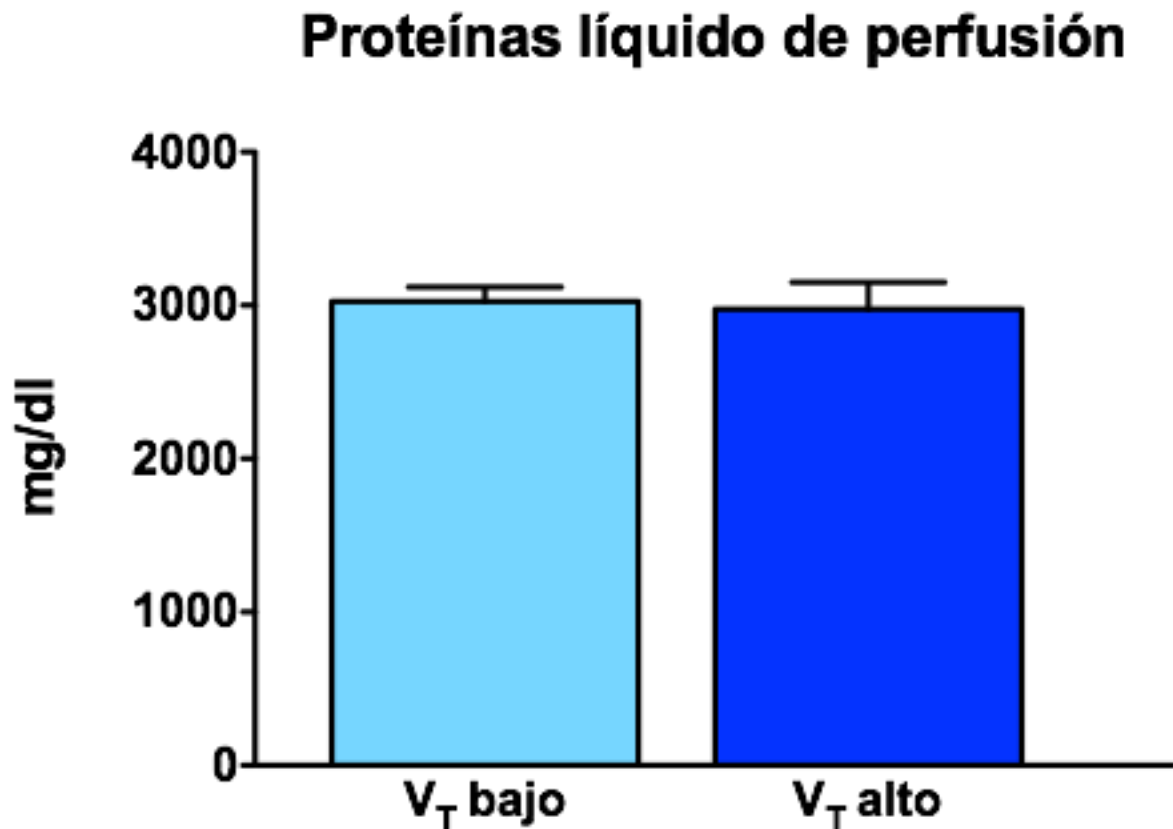


Figura 22. Efecto de VM sobre la concentración de proteínas en el líquido de perfusión. La concentración de proteínas totales en el líquido de perfusión fue similar en el grupo sometido a VM con V_T elevado y en el grupo sometido a V_T bajo. Los valores son media \pm EEM.

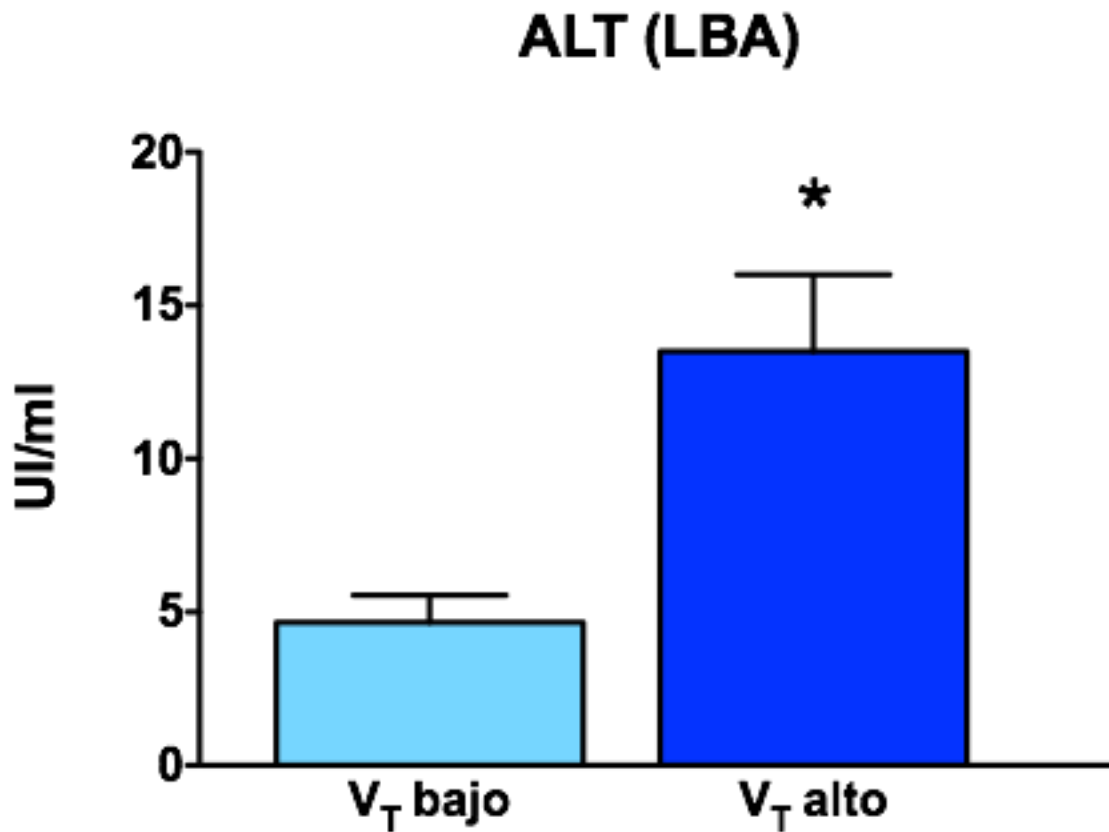
6.5. Daño celular: actividad de ALT, AST y LDH

Con el fin de determinar el desarrollo de daño celular pulmonar inducido por la VM con V_T elevado, se midió (en el LBA y en el líquido de perfusión) la actividad de varios enzimas presentes en el tejido pulmonar.

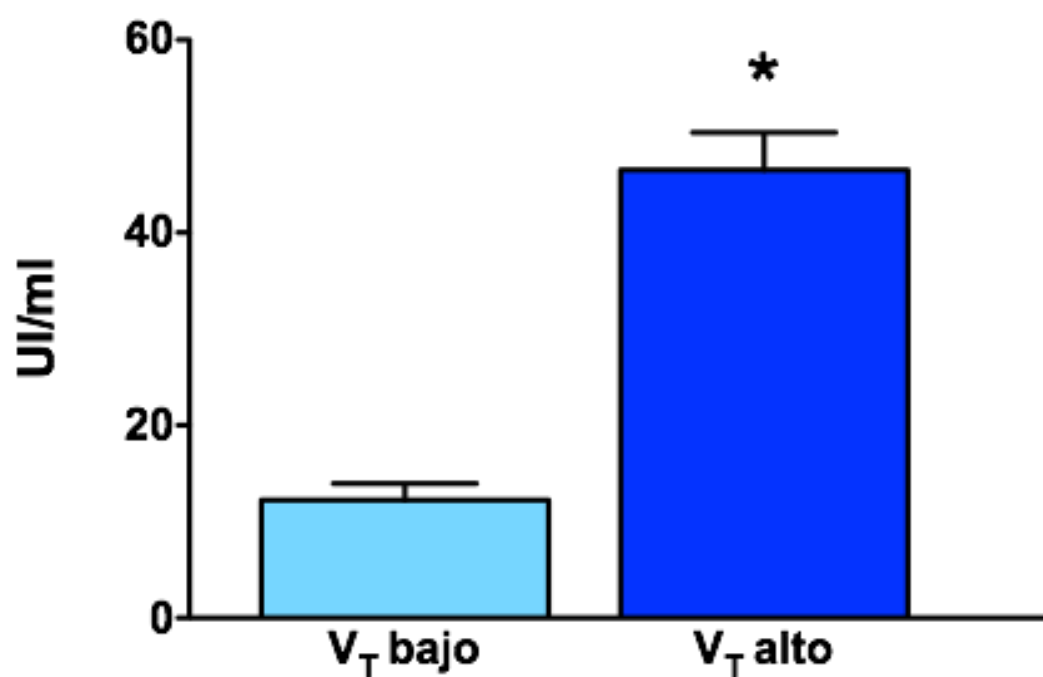
El aumento de la actividad en el LBA indicará daño celular (epitelial) pulmonar. El aumento de la actividad en el líquido de perfusión y la consiguiente disminución de la ratio de la actividad LBA / líquido de perfusión indicará (puesto que en el líquido de perfusión no existen las mencionadas actividades enzimáticas) bien traslocación del enzima desde el espacio alveolar hacia el espacio intravascular por aumento de la permeabilidad alveolocapilar; o bien daño en el aspecto intravascular (endotelial) pulmonar.

6.5.1. LBA

Se analizó la actividad de ALT, AST y LDH en el LBA con el fin de determinar su actividad en el espacio alveolar. Los pulmones del grupo V_T elevado presentaron una elevación significativa de la actividad de ALT ($p=0,034$), AST ($p=0,0002$) y LDH ($p=0,0008$) en el LBA en comparación con el grupo V_T bajo (Fig. 23).



AST (LBA)



LDH (LBA)

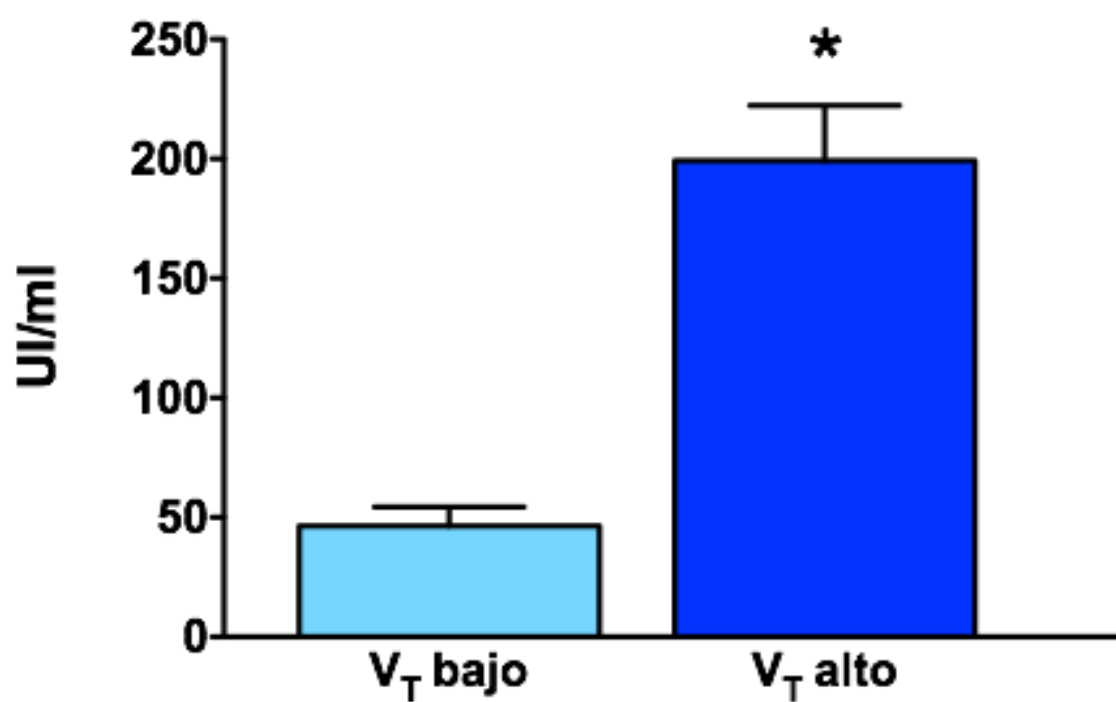
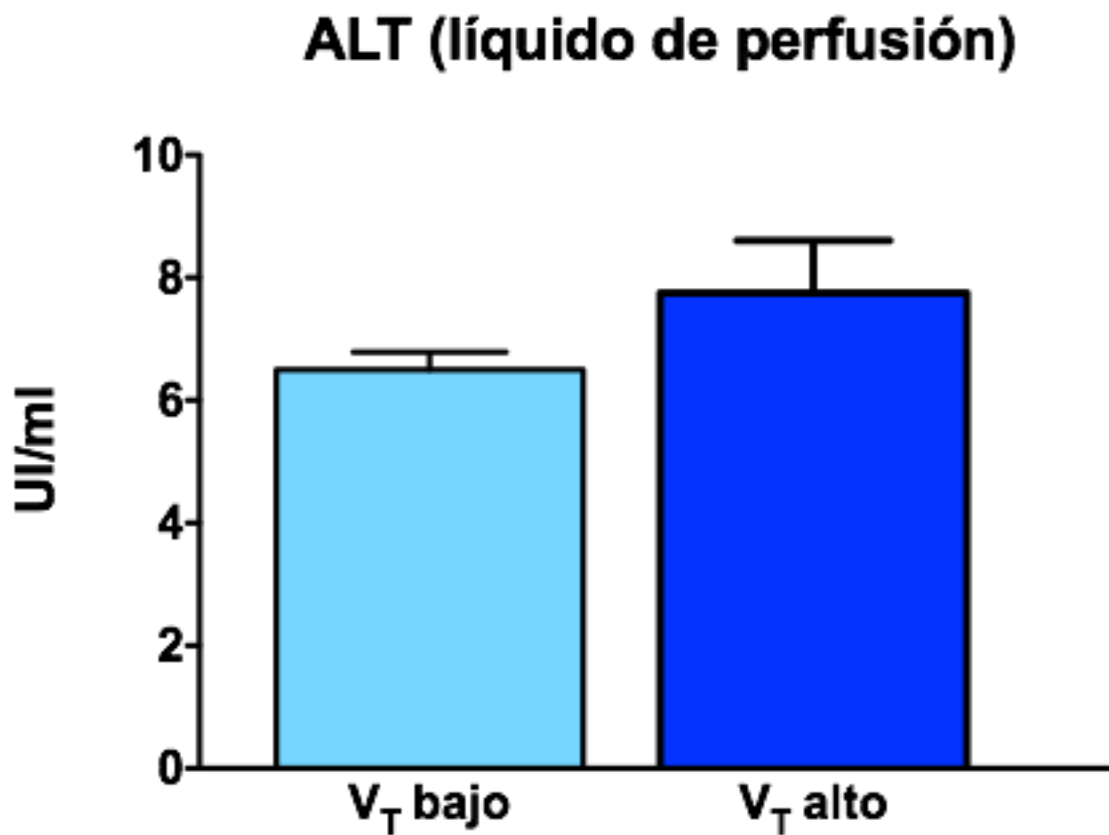


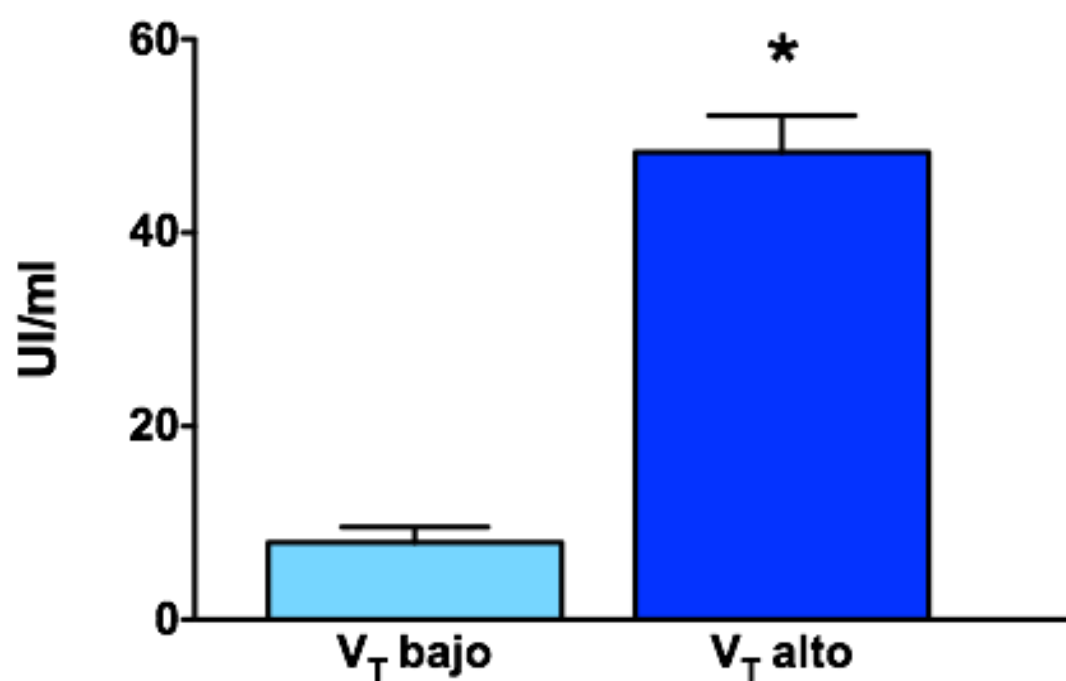
Figura 23. Efecto de VM sobre parámetros de daño celular en el LBA. La actividad de ALT, AST y LDH en el LBA fue mayor en los pulmonares ventilados con VT elevado. LBA, lavado broncoalveolar. Los valores son media \pm EEM. (*) $p<0,05$ versus VT bajo.

6.5.2. Líquido de perfusión

También se analizó la actividad de ALT, AST y LDH en el líquido de perfusión. La actividad de ALT fue similar ($p=0.21$), mientras que la actividad de AST y LDH fue mayor ($p=0,0001$ y $p=0,016$, respectivamente) en el grupo V_T elevado que en el grupo V_T bajo (Fig. 24).



AST (líquido de perfusión)



LDH (líquido de perfusión)

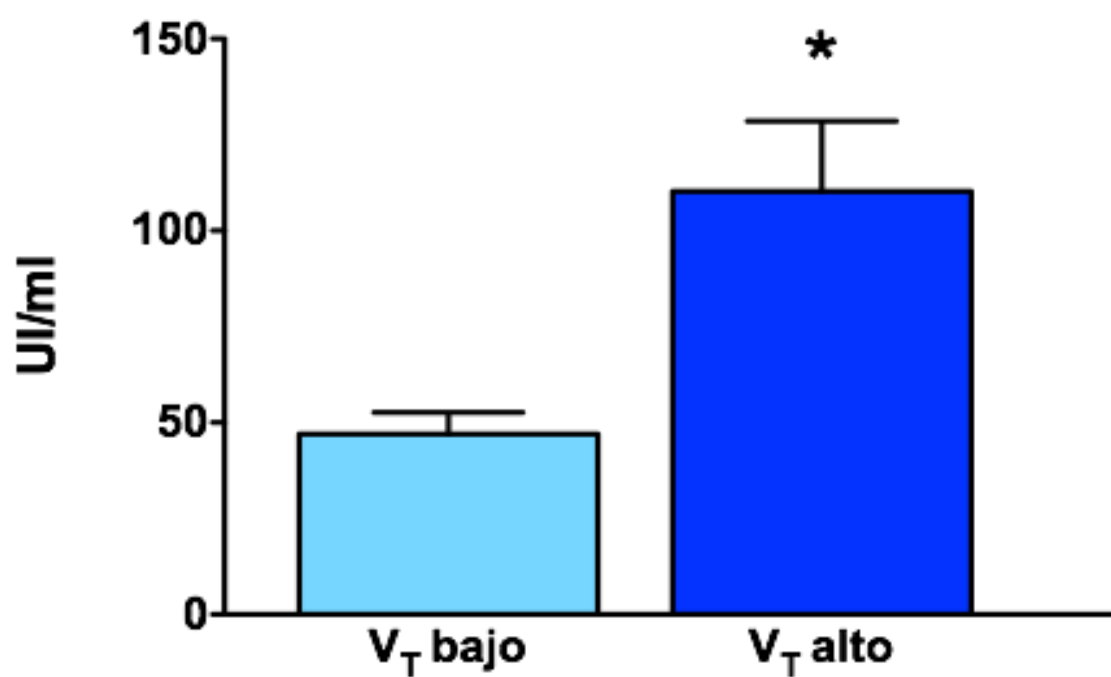


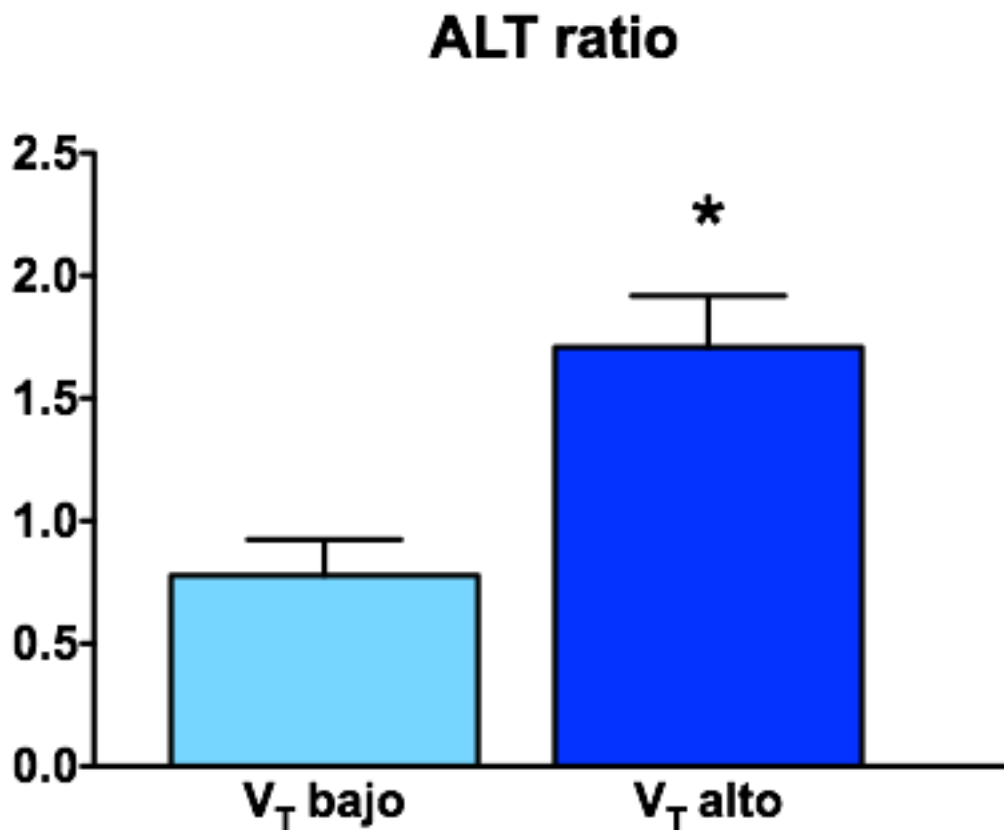
Figura 24. Efecto de VM sobre la actividad de ALT, AST y LDH en el líquido de perfusión. La actividad de AST y LDH en el líquido de perfusión fue mayor en el grupo VT elevado en comparación con el grupo VT bajo. Los valores son media \pm EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo.

6.5.3. Ratio LBA / líquido de perfusión

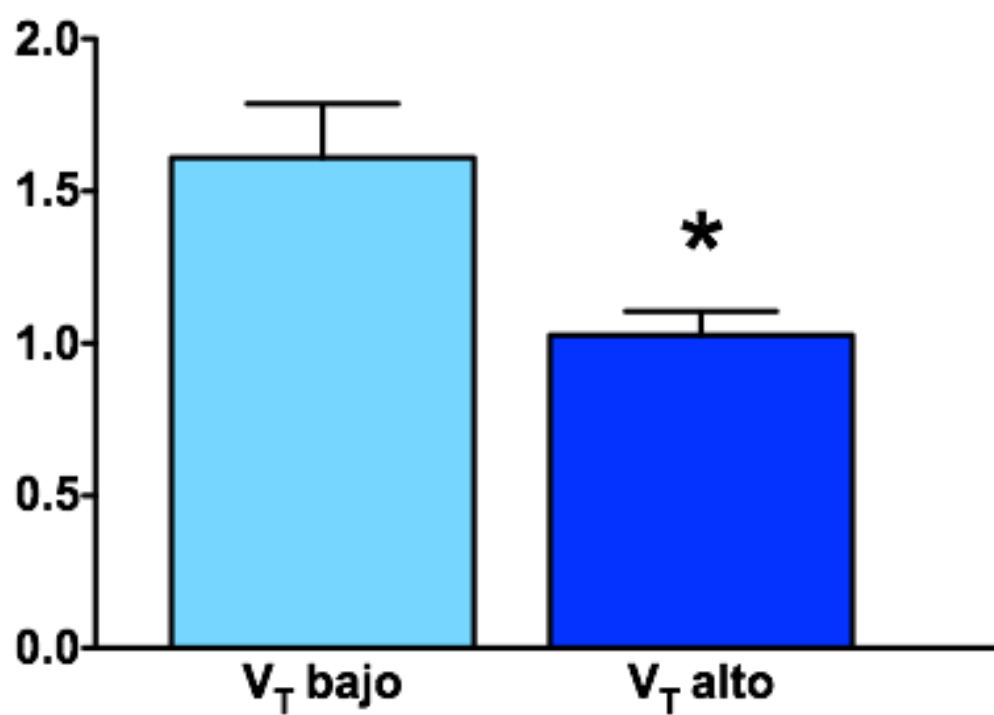
Por último, se calculó la ratio de la actividad en el LBA y la actividad en el líquido de perfusión de las diferentes enzimas con el fin de determinar la integridad de la compartimentalización entre ambos espacios, alveolar y vascular (Fig. 25).

La ratio de la actividad enzimática LBA/líquido de perfusión aumentó ($p=0,02$, $p=0,09$, respectivamente) para ALT, LDH, y disminuyó significativamente para AST ($p=0,045$).

Aunque su interpretación resulta compleja, y será discutida en detalle en la sección correspondiente (ver Discusión), los resultados indican que la VM con V_T elevado se asocia con daño alveolar tanto epitelial como endotelial.



AST ratio



LDH ratio

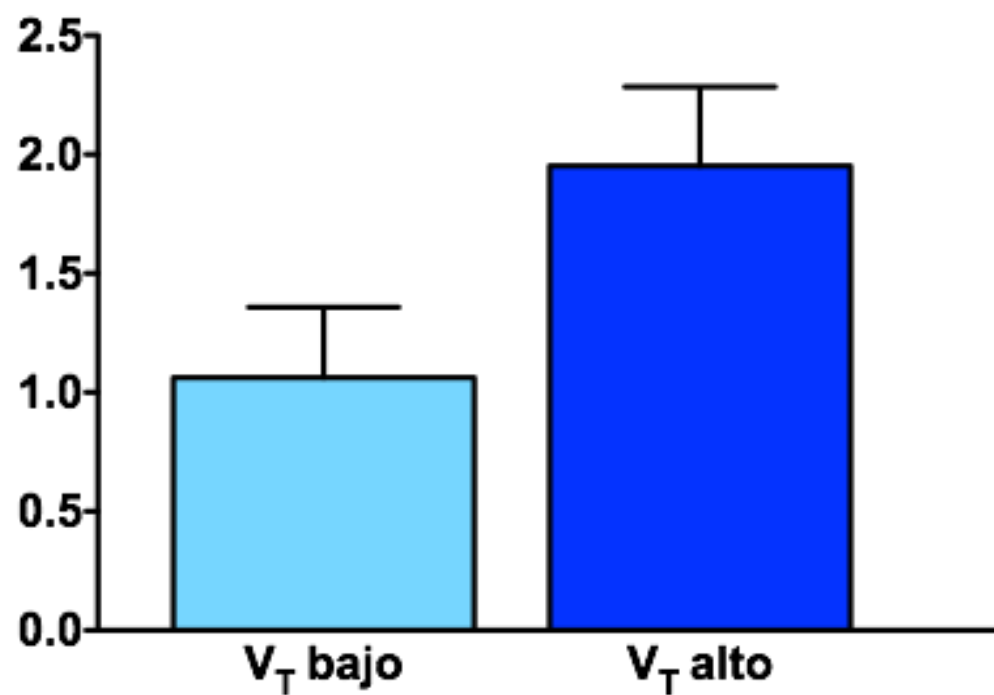


Figura 25. Efecto de VM sobre la ratio LBA / líquido de perfusión de ALT, AST y LDH. Los valores son media±EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo.

6.5.4. Cambios en el equilibrio ácido-base

Con el fin de determinar los cambios en el equilibrio ácido base y en la concentración de lactato, se realizaron mediciones de pH, pCO_2 , bicarbonato, exceso de bases y lactato. La demostración de condiciones constantes de pH es importante para la interpretación de los cambios en la expresión génica entre los diferentes grupos (que pudieran verse modulados por cambios en el pH más que por los cambios en las condiciones ventilatorias).

En el contexto del modelo experimental (órgano aislado) y de las condiciones de oxigenación (administración de carbógeno en el baño del líquido de perfusión) no es de esperar que se encuentren cambios en la pO_2 . Los resultados tienen interés, sin embargo, para documentar la ausencia de cambios significativos en las condiciones del equilibrio ácido-base que pudieran contribuir a cambios en la expresión génica.

El pH, pCO_2 , bicarbonato, exceso de bases y lactato no cambiaron entre los dos grupos (V_T bajo y V_T elevado) (Tabla 4).

	V_T bajo		V_T elevado	
	Basal	Final	Basal	Final
pH	7,40±0,00	7,40±0,10	7,43±0,04	7,34±0,04
pCO_2 (mmHg)	23,6±1,1	22,6±1,2	23,9±1,0	22,0±1,5
pO_2 (mmHg)	164,1±1,6	161,9±2,3	165,4±3,7	167,7±5,4
HCO_3 (mmol)	15,7±1,7	13,4±1,5	16,1±1,4	12,2±1,4
EB (mmol)	-8,8±2,2	-11,9±2,4	-8,3±2	-13,5±2
Hematocrito	-	0,1±0	-	0,1±0
Lactato (mM)	0,2±0,0	0,8±0,1	0,2±0,0	1,8±0,1

Tabla 4. Efecto de la VM sobre el equilibrio ácido base. Ninguno de los cambios resultó significativo. Los valores son media±EEM.

7. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO SE ASOCIA CON UNA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL

En este apartado se analiza la respuesta inflamatoria utilizando tres abordajes: medición de la concentración de diferentes citoquinas, determinación de la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta inflamatoria, medición de la nitración de proteínas y del estrés oxidativo (cambios considerados como parte de la respuesta inflamatoria), en pulmonares ventilados con V_T bajo o V_T elevado.

7.1. Resumen de los resultados del objetivo 2

Los pulmones de los animales del grupo V_T elevado presentaron, en comparación con el grupo V_T bajo:

- Un aumento de la concentración IL-6 y (no alcanzando la significación estadística) de la concentración de IL-10
- Una disminución (sin alcanzar la significación estadística) de la concentración de MCP-1 y MIP-2. No se apreció cambios en la concentración de IL1 β .
- La expresión génica aumentó para MCP1 y MIP-2, así como (sin alcanzar la significación estadística) para IL-6, IL-10 y TNF α .
- La nitración de proteínas (indicativa de la formación de peroxinitrito) y el estrés oxidativo no aumentaron en el grupo sometido a VM con V_T elevado en comparación con el grupo sometido a ventilación con V_T bajo.

Estos resultados indican que la VM con V_T elevado se asocia con cambios en la respuesta inflamatoria que implica tanto a proteínas y genes implicados en la respuesta pro- como anti-inflamatoria.

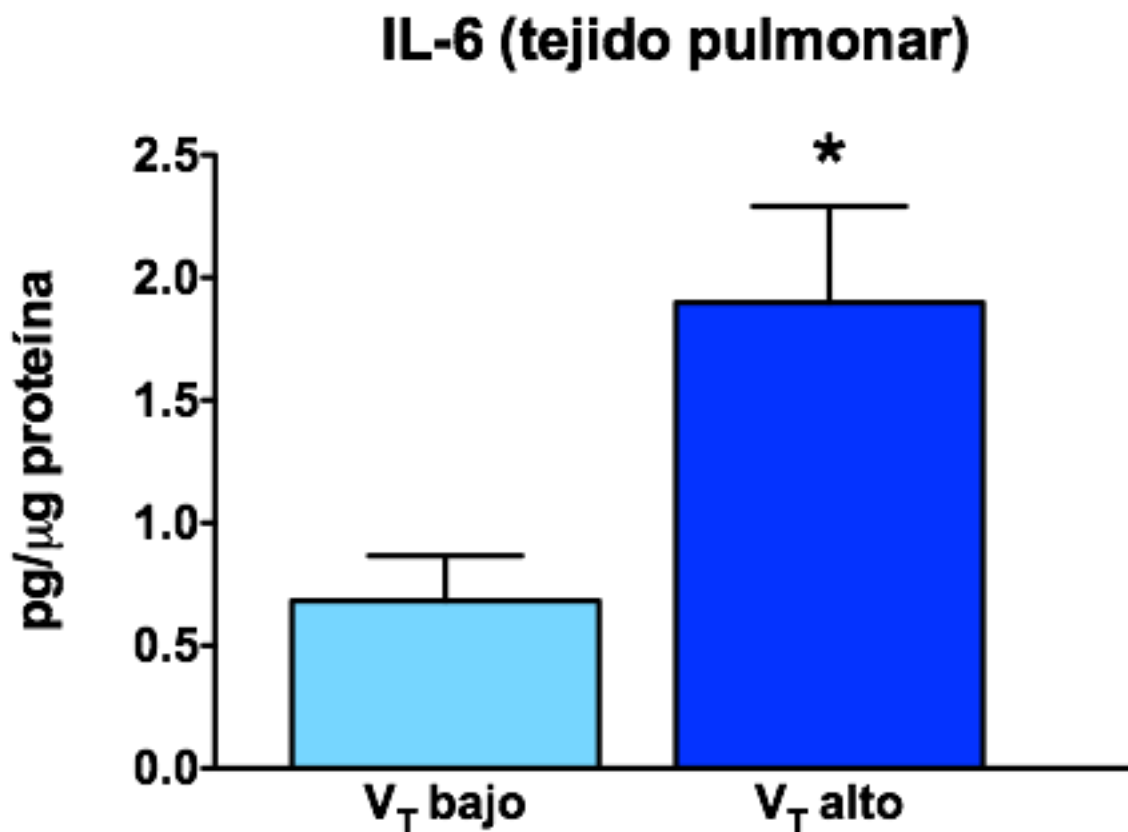
7.2. Inflamación pulmonar

7.2.1. Concentración de Citoquinas

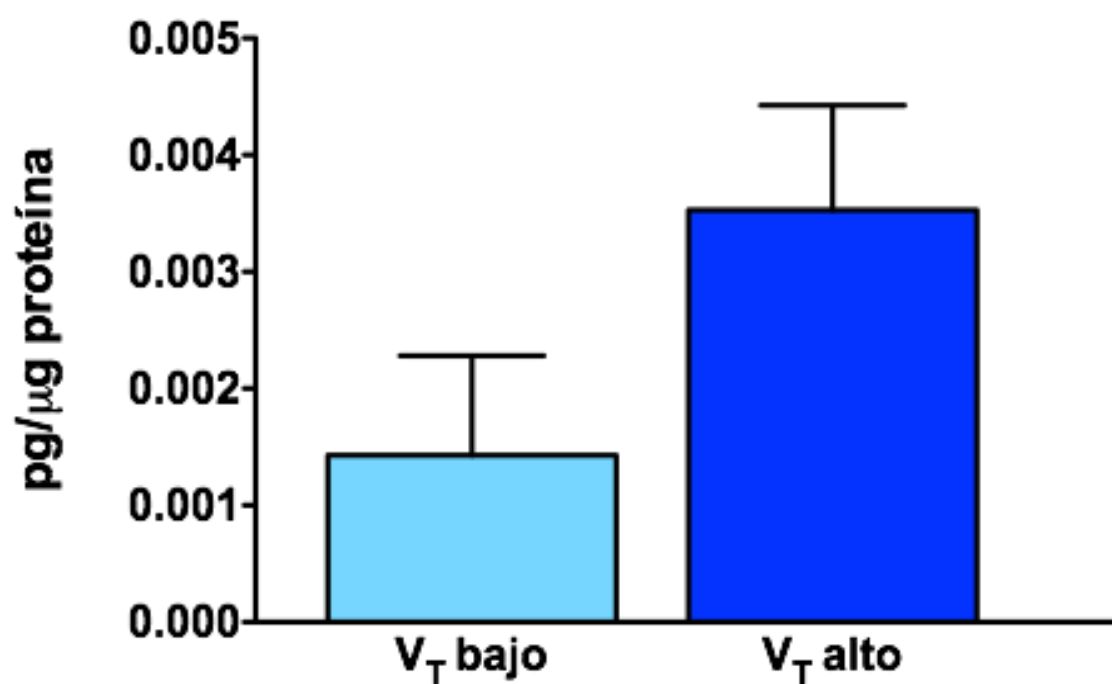
Se determinó el grado de inflamación pulmonar mediante la medición de la concentración de diferentes citoquinas en el tejido pulmonar y de la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria.

Se apreció, al comparar el grupo V_T elevado con V_T bajo, una elevación de IL-6 ($p=0,027$) así como (sin alcanzar la significación estadística) una elevación de IL-10 ($p=0,12$), y una disminución de MCP-1 ($p=0,059$) y MIP-2 ($p=0,14$), sin cambios en la concentración de IL1 β ($p=0,91$) (Fig. 26).

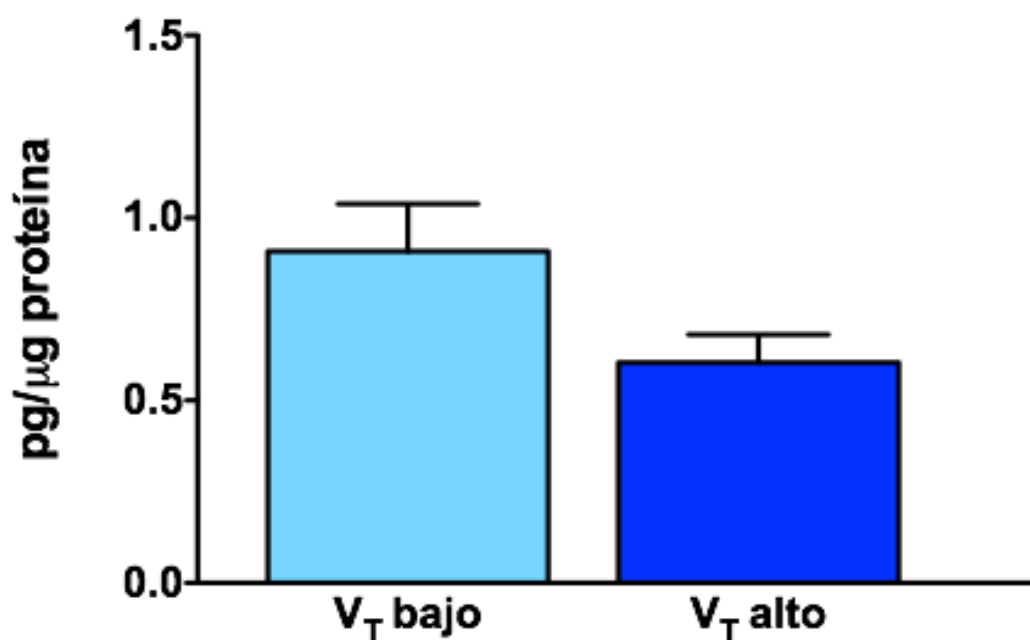
Nuestro modelo de VM con V_T elevado *ex vivo* se acompaña, por tanto, de una respuesta inflamatoria pulmonar que se puede documentar mediante la medición de citoquinas en muestras de tejido pulmonar.



IL-10 (tejido pulmonar)



MCP-1 (tejido pulmonar)



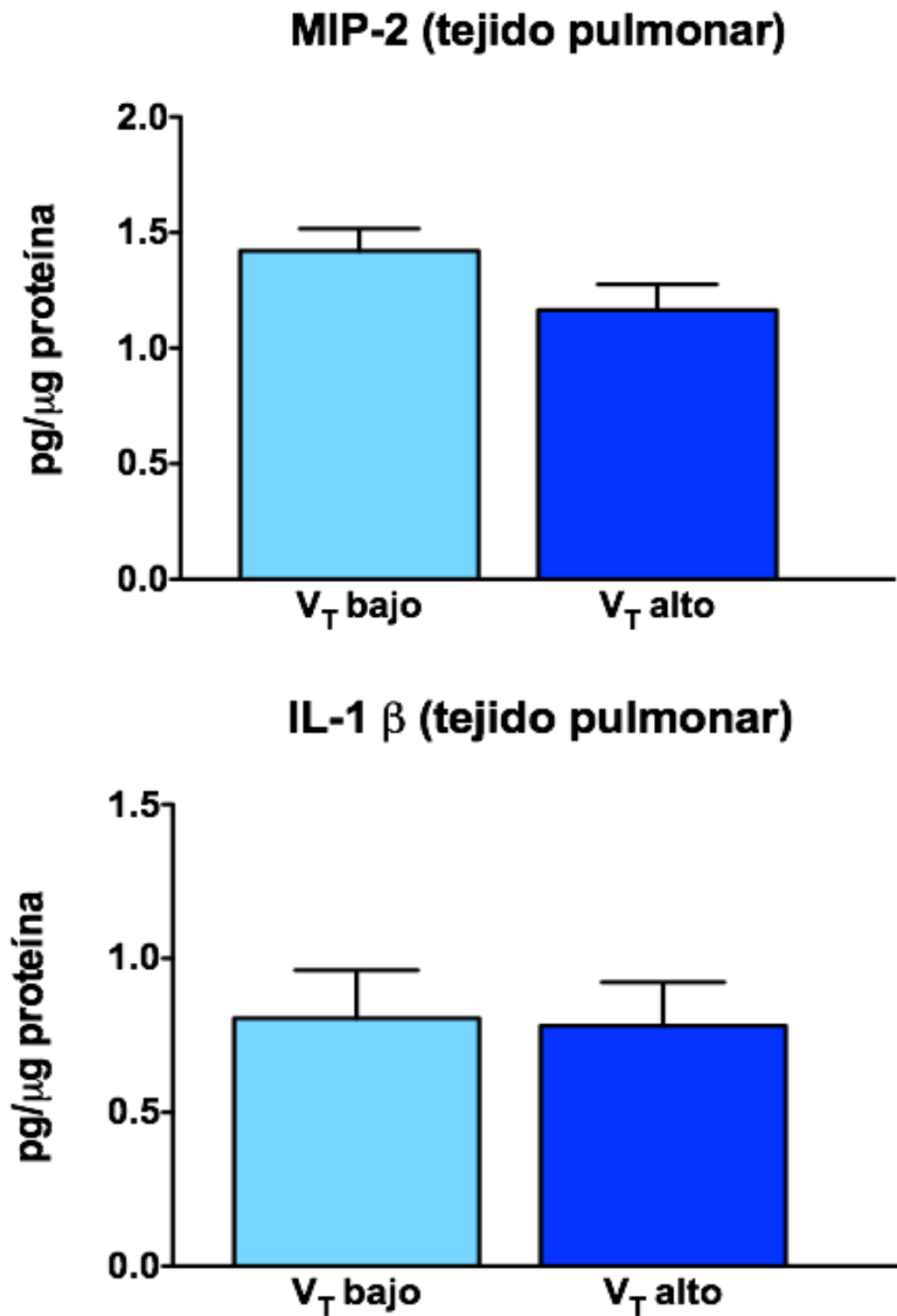


Figura 26. Efecto de VM con VT bajo o VT alto sobre la concentración de citoquinas en el tejido pulmonar. Los valores son media \pm EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo.

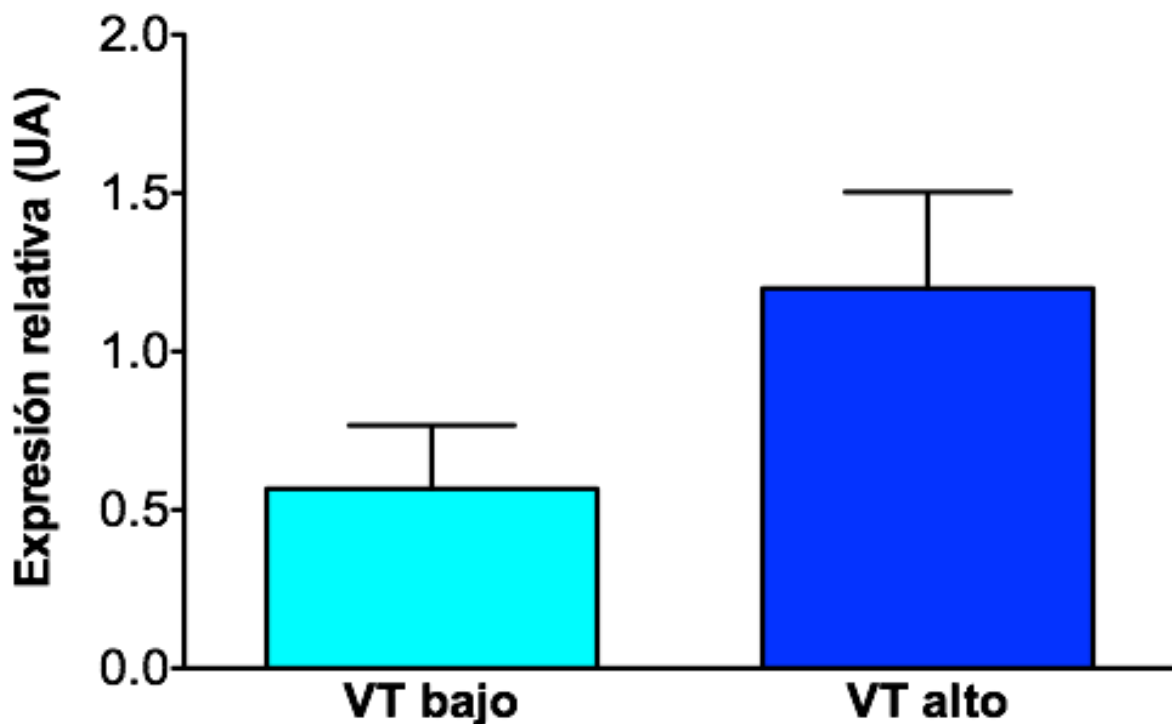
7.2.2. Expresión Génica

Se midió la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta inflamatoria (RT-qPCR) (Fig. 27).

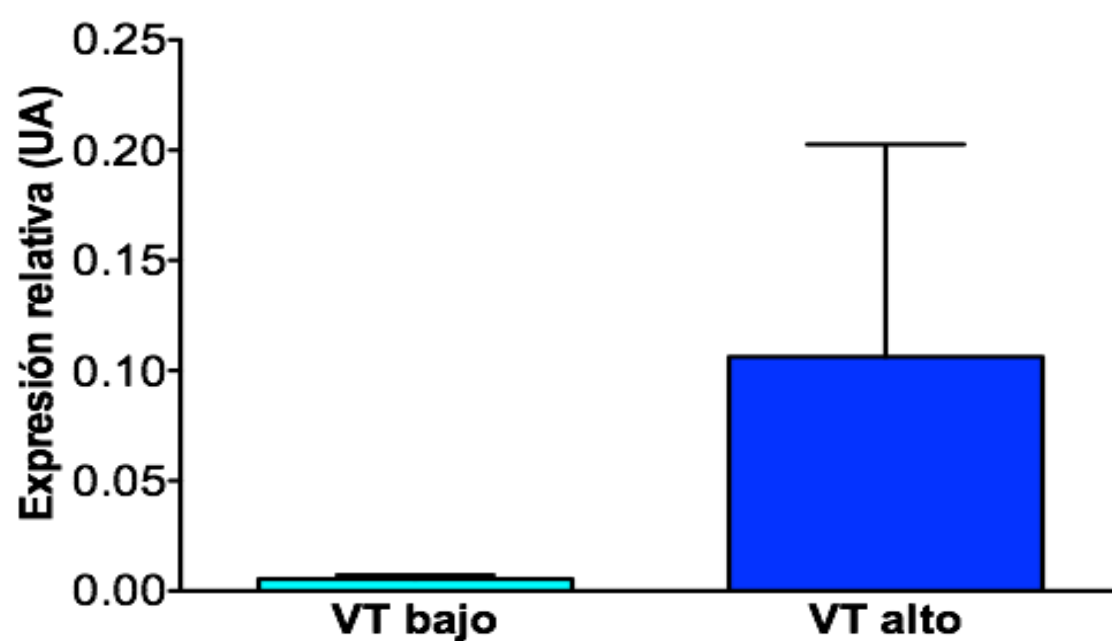
La expresión génica de IL-6 ($p=0,11$), IL-10 ($p=0,32$), MCP-1 ($p=0,02$), MIP-1 ($p=0,02$) y TNF α ($p=0,31$) aumentó en el grupo V_T elevado en comparación con el grupo V_T bajo, aun sin alcanzar la significación estadística en todos los casos.

La VM con V_T elevado se asoció, pues, en comparación con V_T bajo, con cambios en la expresión de varios genes implicados en la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria.

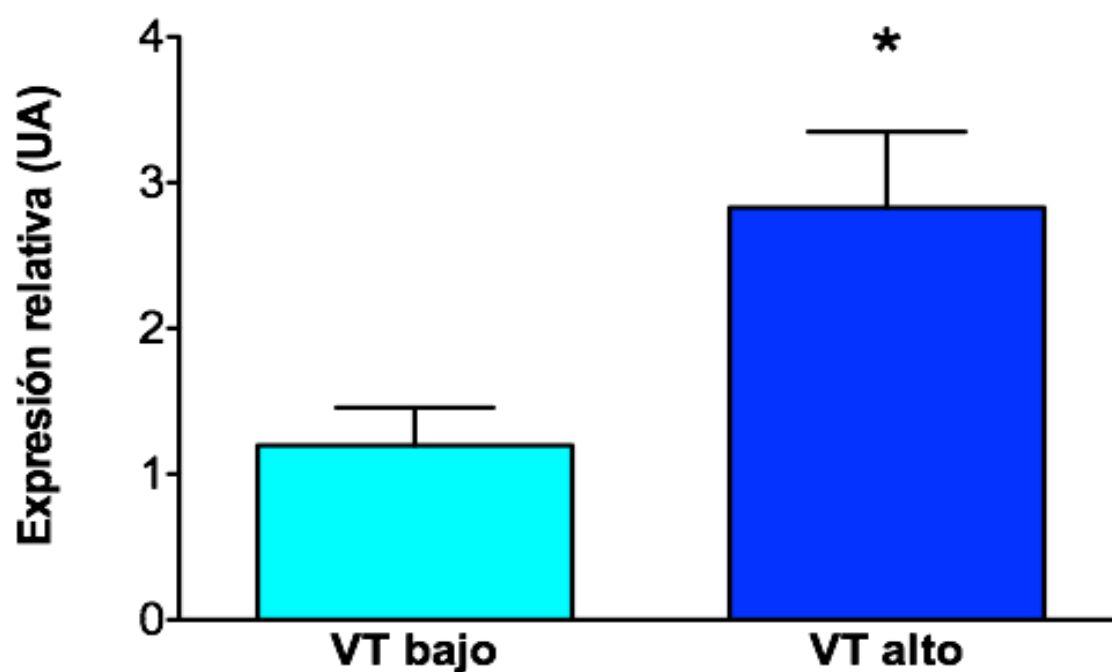
Expresión de IL-6 (tejido pulmonar)



Expresión de IL-10 (tejido pulmonar)



Expresión de MCP-1 (tejido pulmonar)



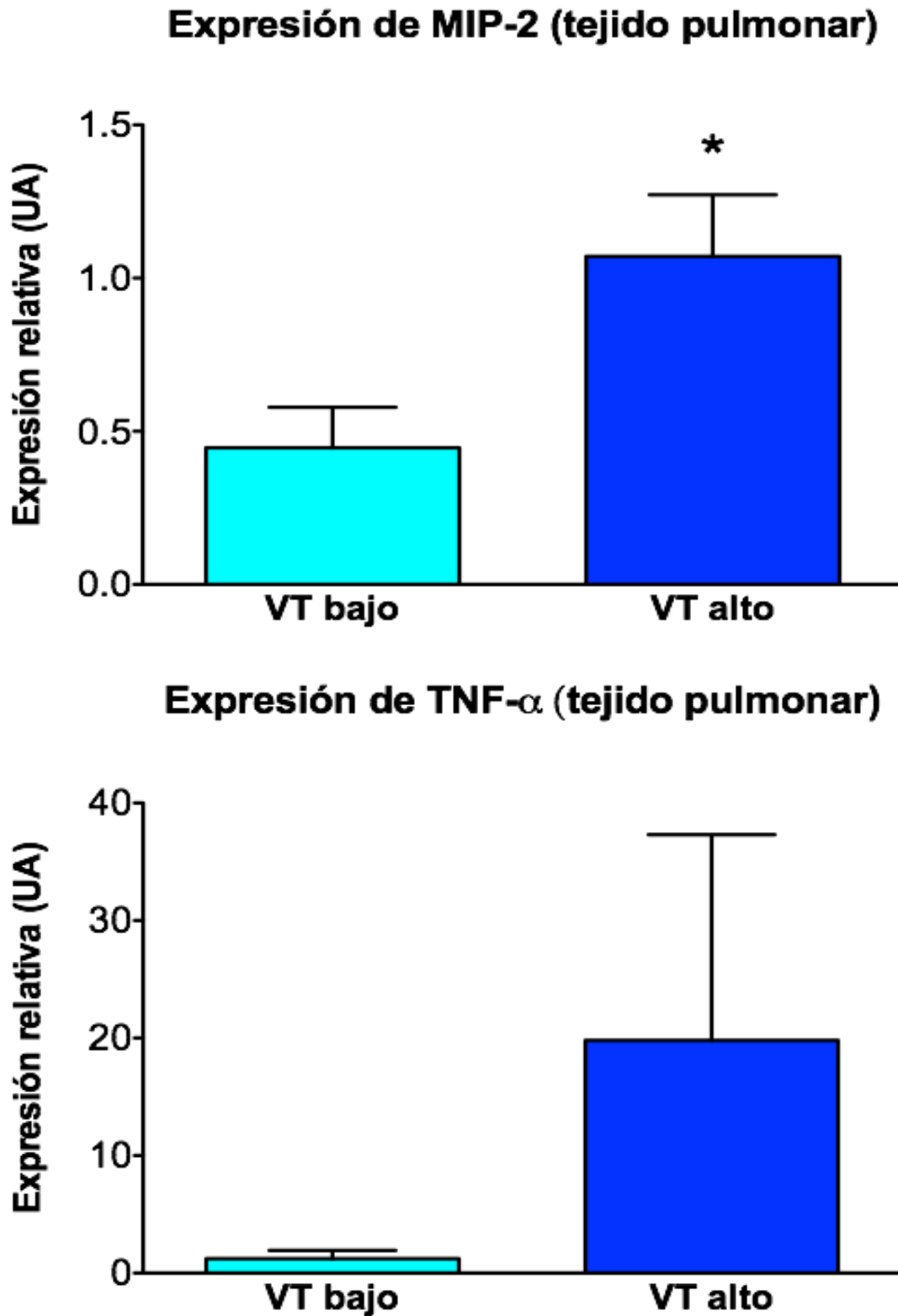


Figura 27. Efecto de VM sobre la expresión de genes (RT-qPCR) implicados en la respuesta inflamatoria en tejido pulmonar. Los valores son media \pm EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo.

7.3. Estrés nitro-oxidativo: Nitración de proteínas

Para determinar la presencia de estrés nitrosativo en el pulmón se cuantificó de forma indirecta la formación de peroxinitrito mediante la determinación de la nitración de proteínas. El peroxinitrito (ONOO^-) es capaz de nitrar los residuos de tirosina de las proteínas, disminuyendo en general la función de la proteína. La detección de residuos de nitrotirosina se realizó mediante dos técnicas, Western-blot e inmunofluorescencia.

Al aplicar V_T elevado (en comparación con V_T bajo), en condiciones de perfusión con KS, la nitración de proteínas no aumentó ($p=0,63$) (Fig. 28).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia tampoco se encontraron cambios en la nitración de proteínas entre el grupo sometido a V_T bajo y el grupo sometido a V_T (Fig. 29).

Los resultados indican, pues, que en el presente modelo de ventilación *ex vivo*, la VM con V_T elevado no se asocia con cambios en la nitración de proteínas.

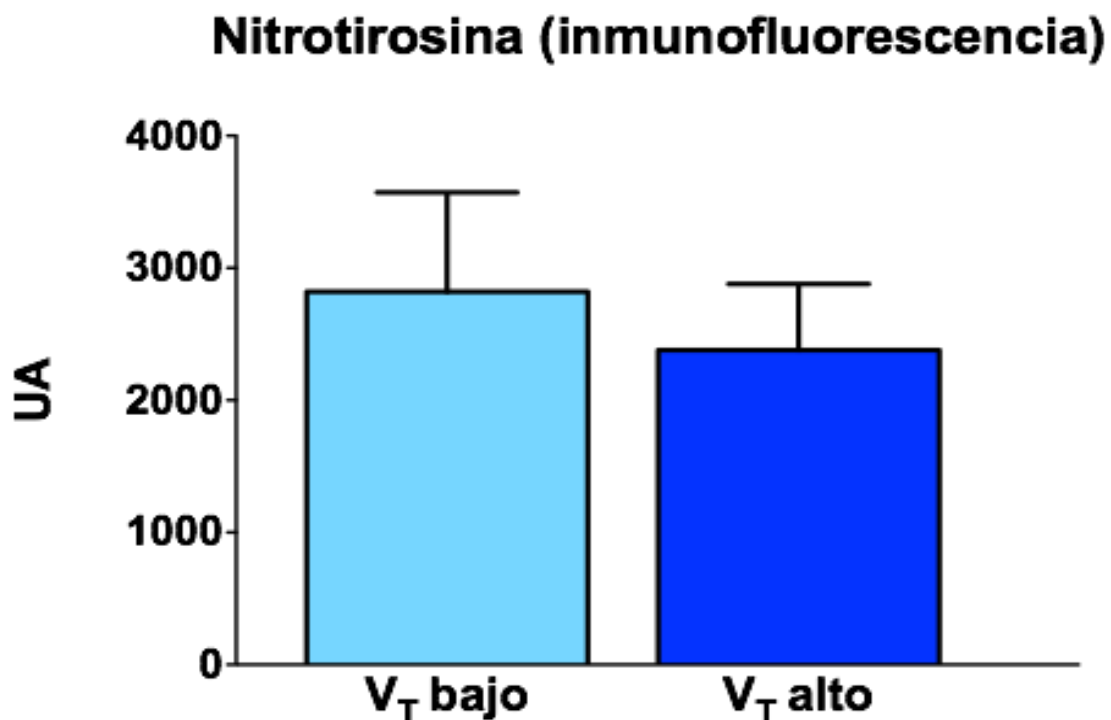


Figura 28. Efecto de la VM en la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (Western blot). Los valores son media ± EEM. UA, unidades arbitrarias. Los cambios no resultaron significativos.

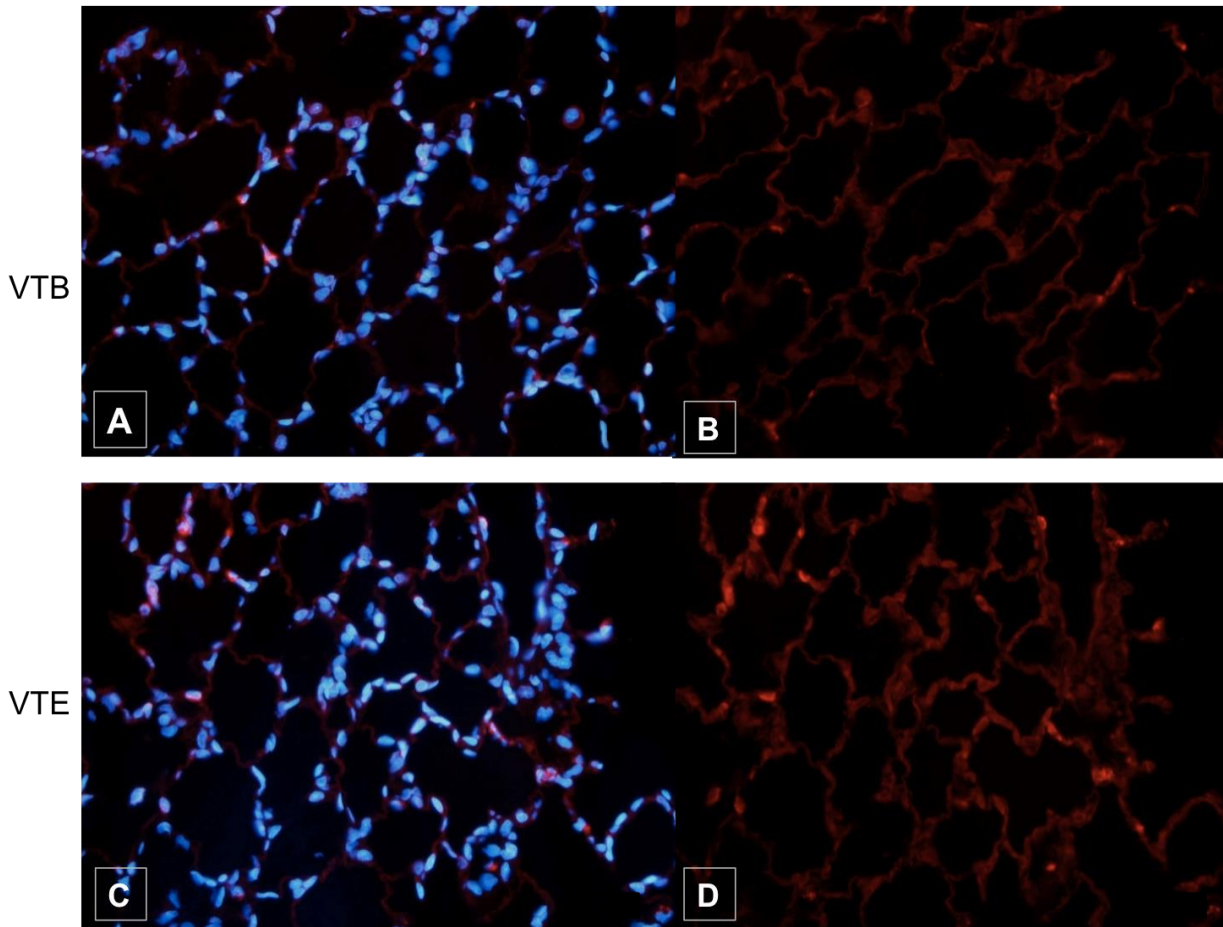


Figura 29. Efecto de la VM sobre la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (inmunofluorescencia para anticuerpos anti-nitrotirosina). Se muestran casos representativos de cortes procedentes de pulmones sometidos a VM con VT bajo (A, B) o VT elevado (C, D). No se aprecia aumento de la inmunofluorescencia en el grupo que recibió VT elevado en comparación con VT bajo. A y C: tinción DAPI (para visualizar los núcleos celulares). B y D: inmunofluorescencia para 3-nitrotirosina.

7.4. Estrés oxidativo

Se determinó el grado de estrés oxidativo mediante la técnica de fluorescencia a DHE (ver Métodos, técnicas de estudio).

La aplicación de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) no se asoció con cambios en el estrés oxidativo (Fig. 30).

Los resultados indican, pues, que en el presente modelo de ventilación *ex vivo*, la VM con V_T elevado no se asocia con cambios en el grado de estrés oxidativo.

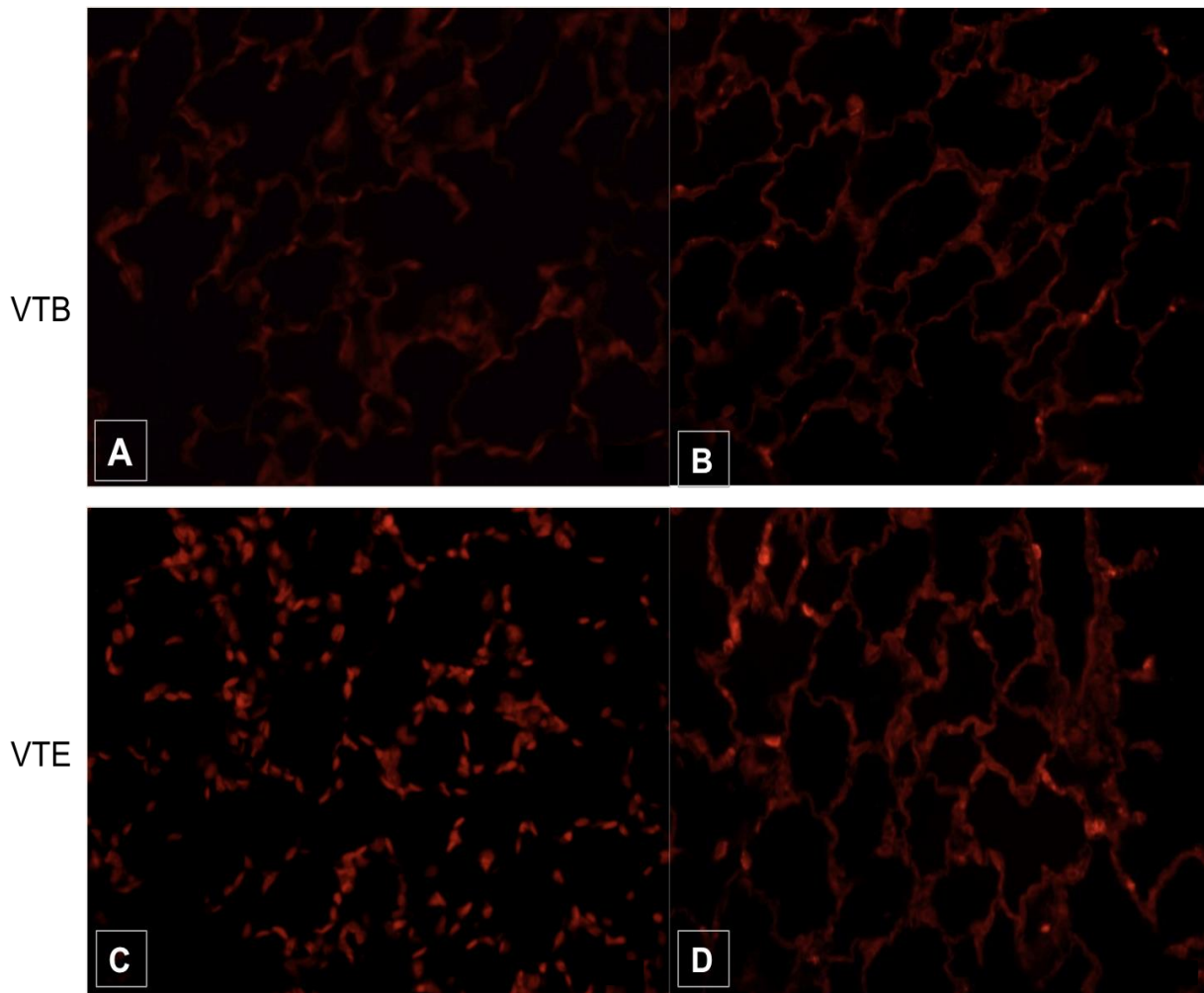


Figura 30. Efecto de la VM sobre el estrés oxidativo producido en muestras de tejido pulmonar (fluorescencia para DHE) (ver Métodos) (40X). Se muestran casos representativos de cortes procedentes de pulmones sometidos a VM con VT bajo (A, B) o VT elevado (C, D). Ningún caso presentó un aumento de la fluorescencia a DHE, indicando ausencia de estrés oxidativo.

8. RESULTADOS DEL OBJETIVO 3: DEMOSTRAR QUE LA COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN MODIFICA LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO

En este apartado se amplió el conocimiento obtenido en los resultados correspondientes a los objetivos 1 y 2, que describieron cambios en la estructura y función y en la respuesta inflamatoria de los pulmones *ex vivo* sometidos a VM con V_T elevado.

En el presente objetivo se describen los efectos de la composición del líquido de perfusión (sin y con elementos sanguíneos) en los cambios inducidos por la VM con V_T elevado en las mismas variables de estudio (estructura y función pulmonares, y respuesta inflamatoria del pulmón).

Los pulmones fueron sometidos a ventilación con V_T bajo y V_T elevado, en condiciones de perfusión, bien con solución de Krebs (KS) o bien con solución de Krebs a la que se adicionaron elementos sanguíneos (KS+S) (sangre autóloga, ver Métodos).

8.1. Resumen de los resultados del Objetivo 3

Los resultados indican que los efectos de la VM utilizando V_T elevado sobre el daño pulmonar y la respuesta inflamatoria pulmonar fueron modificados en algunos aspectos por la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión.

Los cambios inducidos por la VM utilizando V_T elevado en presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (KS+S), en comparación con los cambios observados en ausencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (KS), fueron:

- Similar deterioro de la mecánica respiratoria.
- Similar grado de daño histológico pulmonar.
- Similar aumento de la concentración de proteínas totales en el LBA.

- Cambios similares en la actividad de ALT, AST y LDH en el LBA, acompañados de un mayor aumento en el líquido de perfusión.
- Menor elevación de la concentración de ciertas citoquinas y de la expresión génica correspondiente.
- Mayor estrés nitro-oxidativo.

Los resultados presentados sugieren que la presencia de elementos sanguíneos como parte de la composición del líquido de perfusión modula la respuesta inflamatoria inducida por la VM, y que existe una disociación, al menos realizando las mediciones en un sólo punto en el tiempo, entre la magnitud de la respuesta inflamatoria (medida por la concentración y expresión génica de citoquinas) y el grado de nitración de proteínas y de estrés nitro-oxidativo.

8.2. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP

En T=-5 min ambos grupos (KS y KS+S) mostraron el mismo valor de PIP, puesto que se encontraban recibiendo la misma estrategia ventilatoria ($V_T=6$ mL/kg + PEEP=5 cmH₂O) en el periodo de estabilización previo a la aleatorización.

En pulmones sometidos a V_T elevado (en comparación con V_T bajo) se asoció con un aumento significativo de la PIP desde T=0 min hasta T=150 min ($p<0,0001$ en el grupo KS, $p<0,0001$ en el grupo KS+S) (Fig. 31, Tabla 5).

En pulmones sometidos a V_T bajo, la diferencia en la PIP entre T=0 min y T=150 min no fue estadísticamente significativa en el grupo KS en comparación con el grupo KS+S ($p=0,11$).

En pulmones sometidos a V_T alto, la diferencia en la PIP entre T=0 min y T=150 min tampoco fue estadísticamente significativa en el grupo KS en comparación con el grupo KS+S ($p=0,74$).

Estos resultados indican que la composición del líquido de perfusión no afecta al deterioro en la mecánica pulmonar inducido por la VM utilizando V_T elevado.

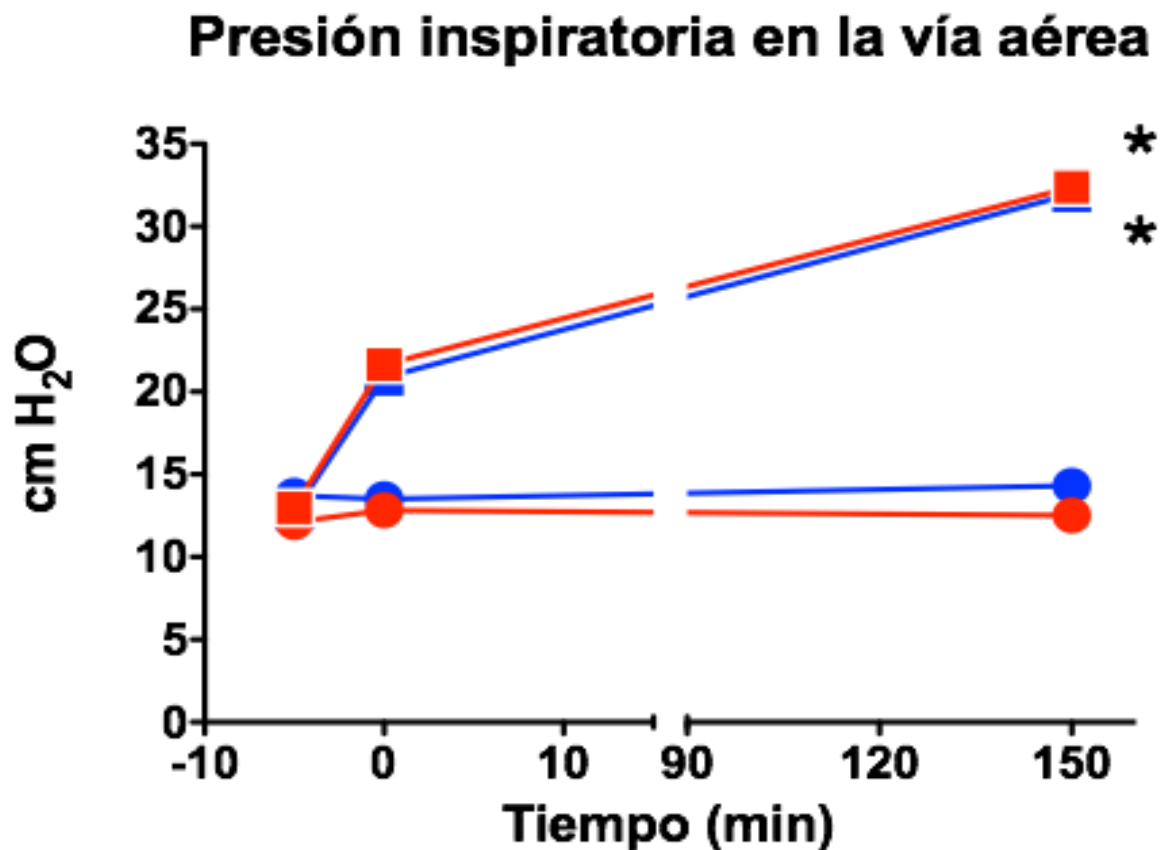
La PAP no presentó un aumento significativo en ninguno de los grupos (Fig. 31, Tabla 5).

El cambio en la PAP al administrar V_T elevado (en comparación con V_T bajo) no fue significativo ($p=0,30$ en el grupo KS, $p=0,36$ en el grupo KS+S).

El cambio en la PAP desde $T=0$ min hasta $T=150$ min al aplicar V_T bajo fue similar en KS que en KS+S ($p=0.89$).

Asimismo, el cambio en la PAP al aplicar V_T bajo desde $T=0$ min hasta $T=150$ min fue similar en KS en comparación con KS+S ($p=0.09$).

Nuestros resultados indican, por tanto, que la VM con V_T elevado induce un deterioro de las propiedades mecánicas del pulmón, y que este cambio no es modificado por la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión.



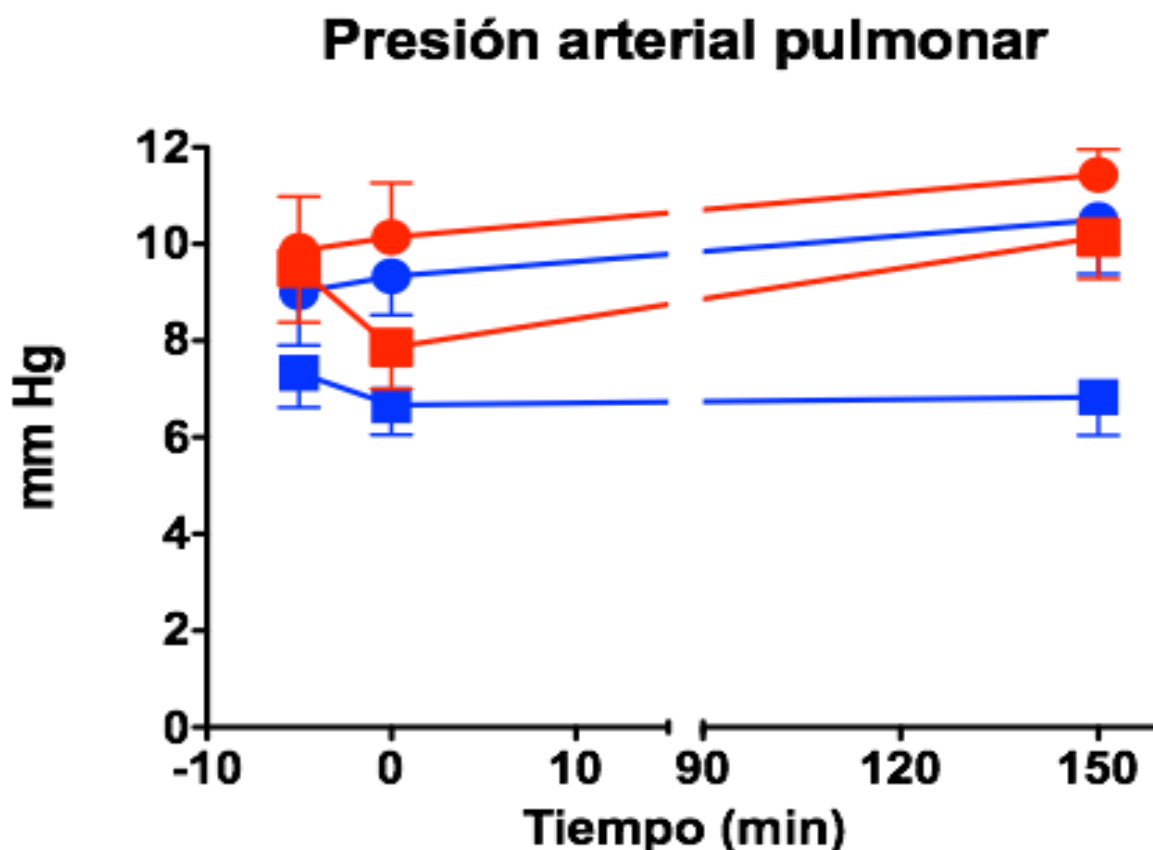


Figura 31. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la PIP y en la PAP. La PIP aumentó durante el tiempo de VM en los grupos sometidos a VT elevado (cuadrados), perfundidos con KS (azul) y con KS+S (rojo), mientras que permaneció constante en los grupos sometidos a VT bajo (círculos) perfundidos con KS (azul) o con KS+S (rojo). La PAP no varió a lo largo del tiempo de evolución en ninguno de los grupos. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media \pm EEM. (*) $p < 0,05$ para la evolución en el tiempo.

8.3. Estudio histológico

En los pulmones ventilados con V_T bajo perfundidos con KS o con KS+S la MO fue normal (el score de daño pulmonar fue cero).

Al administración de V_T elevado se asoció con una elevación del score de daño pulmonar, tanto en KS como en KS+S ($p < 0,0001$ para ambos casos).

El score de daño pulmonar para los grupos V_T bajo fue idéntico en KS *versus* KS+S.

El score de daño pulmonar para los grupos V_T elevado fue también similar en KS *versus* KS+S ($p = 0,50$) (Fig. 32, 33, Tabla 5).

Así, pues, la composición del líquido de perfusión no afectó al desarrollo de daño pulmonar inducido por la V_T valorado mediante examen histológico.

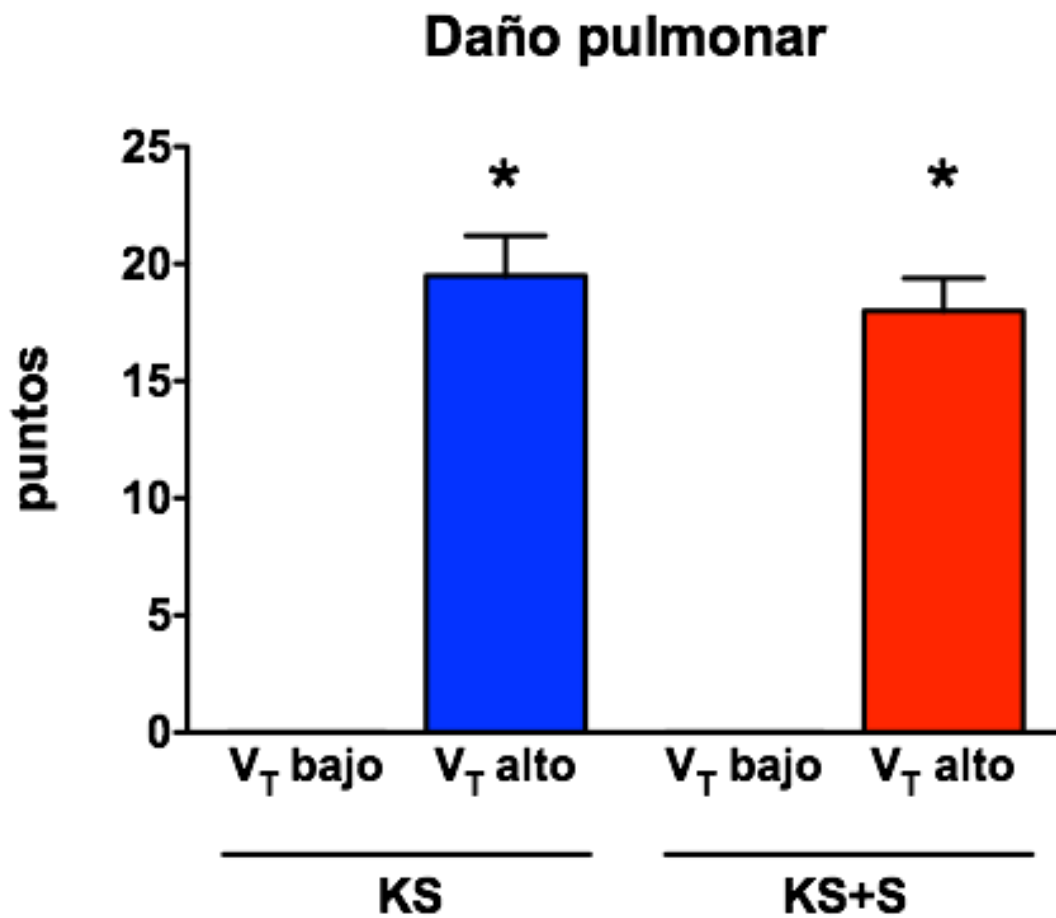


Figura 32. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios histológicos inducidos por la VM. En pulmones perfundidos con KS+S, la VM con VT elevado, en comparación con la ventilación con VT bajo, se asoció con un aumento del *score* de daño pulmonar. La composición del líquido de perfusión (KS *versus* KS+S) no modificó estos cambios. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. (*) $p < 0,05$ *versus* VT bajo.

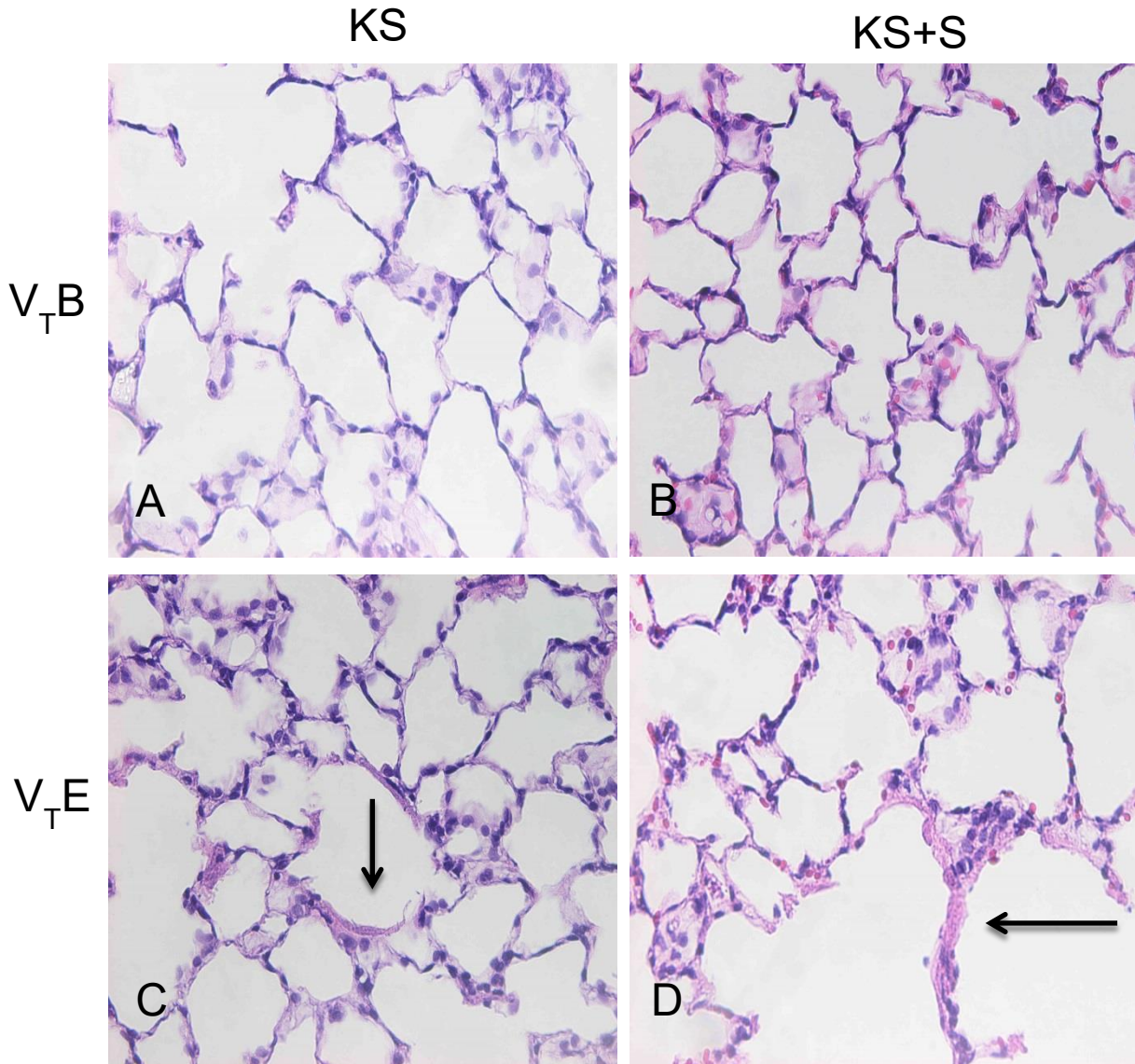


Figura 33. Cambios histológicos inducidos por la VM (HE x20). La VM utilizando VT elevado y perfundido con KS (C) o con KS+S (D) se asoció con cambios histológicos característicos de DAD. Se aprecia la presencia de membranas hialinas (indicado con una flecha) en las muestras representativas de tejido pulmonar procedente de los casos sometidos a VT elevado, perfundidos con KS (C) o con KS+S (D). KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos.

8.4. Permeabilidad alveolo-capilar

Se analizó la concentración de proteínas en el LBA y en el líquido de perfusión.

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación de la concentración de proteínas en el LBA en el grupo KS ($p=0,0005$) y en el grupo KS+S ($p<0,0001$).

En los grupos V_T bajo, la concentración de proteína era similar en KS *versus* KS+S ($p=0,11$).

En los grupos V_T elevado, la diferencia en concentración de proteínas tampoco era estadísticamente significativa entre KS y KS+S ($p=0,066$) (Fig. 34, Tabla 5).

También se analizó la concentración de proteínas en el líquido de perfusión.

La administración de V_T elevado no se asoció con cambios en la concentración de proteínas en el líquido de perfusión ($p=0,81$ y $p=0,74$, para KS y KS+S, respectivamente).

En los grupos V_T bajo, la concentración de proteínas en el líquido de perfusión fue mayor en el grupo perfundido con KS+S *versus* KS ($p=0,02$).

En los grupos V_T alto, la concentración de proteínas en el líquido de perfusión también (no alcanzando la significación estadística) fue mayor en el grupo perfundido con KS+S *versus* KS ($p=0,77$) (Fig. 35, Tabla 5).

Los presentes resultados indican, pues, que la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (KS+S) no modificó el aumento de la permeabilidad alveolocapilar inducido por la VM con V_T elevado, mientras que aumentó la concentración de proteínas en el líquido de perfusión (en comparación con la presencia de sólo KS).

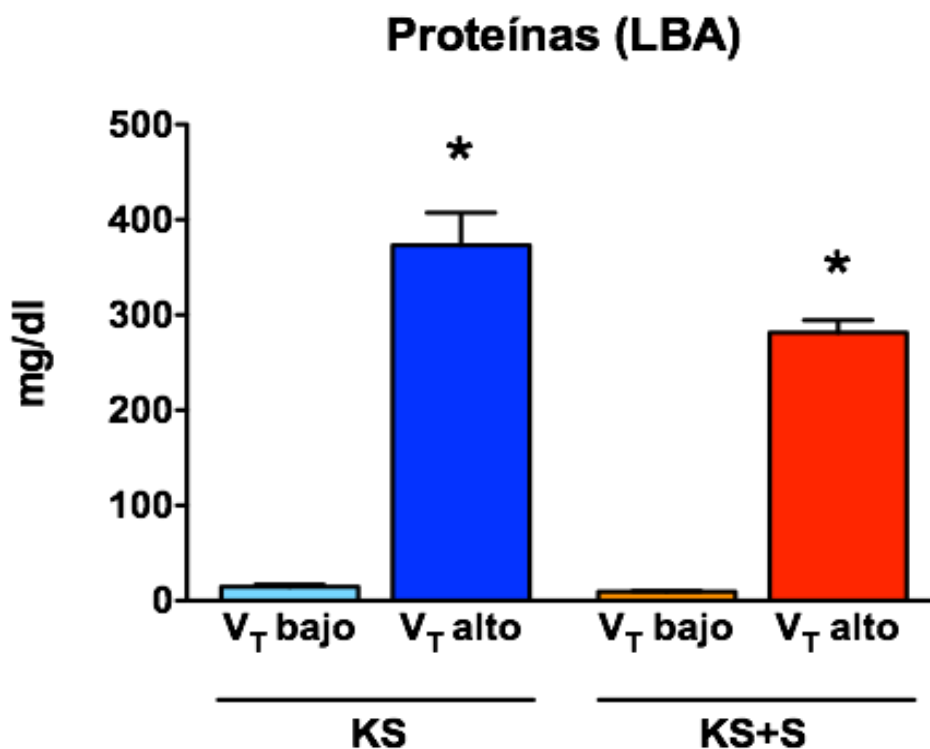


Figura 34. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la concentración de proteínas en el LBA. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. LBA, lavado broncoalveolar. Los valores son media±EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo.

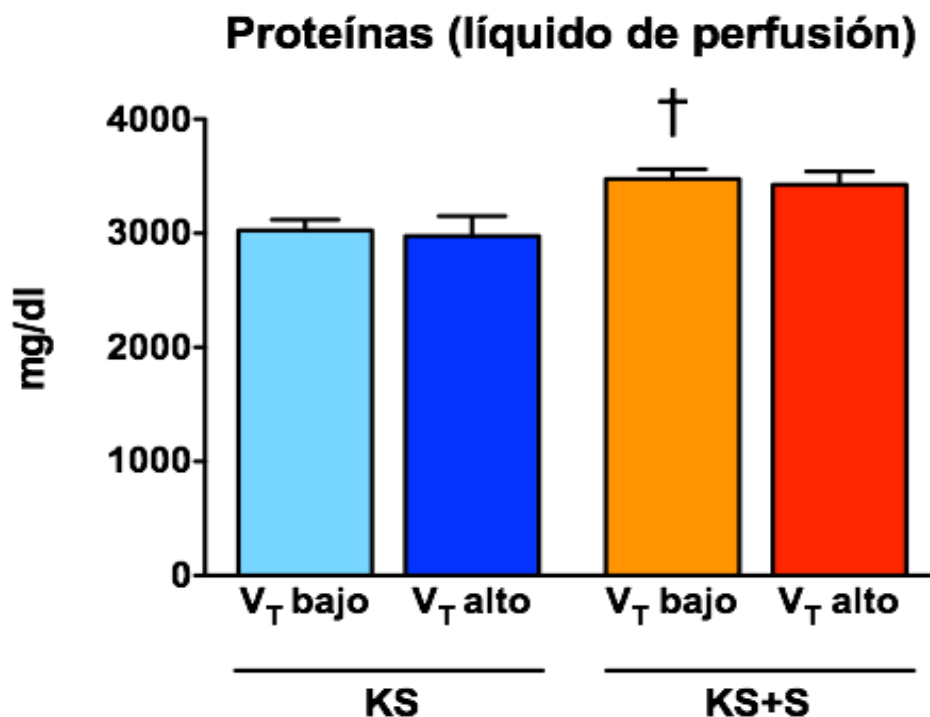


Figura 35. Concentración de proteínas en el líquido de perfusión en los diferentes grupos. La VM utilizando VT elevado, en comparación con VT bajo, no cambió la concentración de proteínas en el líquido de perfusión. La perfusión con elementos sanguíneos en el líquido de perfusión se asoció con

Resultados

una mayor concentración de proteínas en el líquido de perfusión. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media±EEM. (*) p<0,05 *versus* VT bajo. (†) p<0,05 *versus* KS.

	KS		KS+S	
	V _T bajo	V _T elevado	V _T bajo	V _T elevado
Presión inspiratoria (cm H₂O) ¶				
t=-5 min	13,7±0,4	12,74±0,4	12,11±0,4	12,97±0,3
t=0 min	13,5±0,3	20,85±1,1	12,83±0,4	21,64±0,6
t=150 min	14,3±0,3	32,0±0,4	12,51±0,4	32,37±0,5
Presión arterial pulmonar (mm Hg)				
t=-5 min	9,000±1,095	7,333±0,7149	9,857±1,122	9,500±1,118
t=0 min	9,333±0,8028	6,667±0,6146	10,14±1,122	7,857±0,8571
t=150 min	10,50±1,118	6,833±0,7923	11,43±0,5281	10,14±0,8571
Daño pulmonar (score)	0,0±0,0	19,50±1,708 *	0,0±0,0	18,00±1,397 *
Proteínas (LBA) (mg/dl)	14,8±2,4	373,3±34,1 *	9,5±0,9	281,5±13,1 *
Proteínas (líquido de perfusión) (mg/dl)	3025,0±94,7	2975,0±175,0	3475,0±85,4 †	3425,0±118,1
Nitración de proteínas (UA)	2820± 750,9	2379± 500,8	4363± 585,7	14720± 2456 *†

Tabla 5: Variables relacionadas con la función y estructura del pulmón. LBA, lavado broncoalveolar. KS, solución de Krebs. KS+S: solución de Krebs con elementos sanguíneos. UA, unidades arbitrarias. Los valores son media±EEM. (¶) Presión inspiratoria en la vía aérea. (*) p<0,05 *versus* VT bajo. (†) p<0,05 *versus* KS.

8.5. Daño celular: actividad de AST, ALT y LDH en el LBA y en el líquido de perfusión

Se analizó la actividad de ALT, AST y LDH en el LBA y en el líquido de perfusión. La composición del líquido de perfusión (KS o KS+S) afectó a la actividad de enzimas indicativos de daño celular.

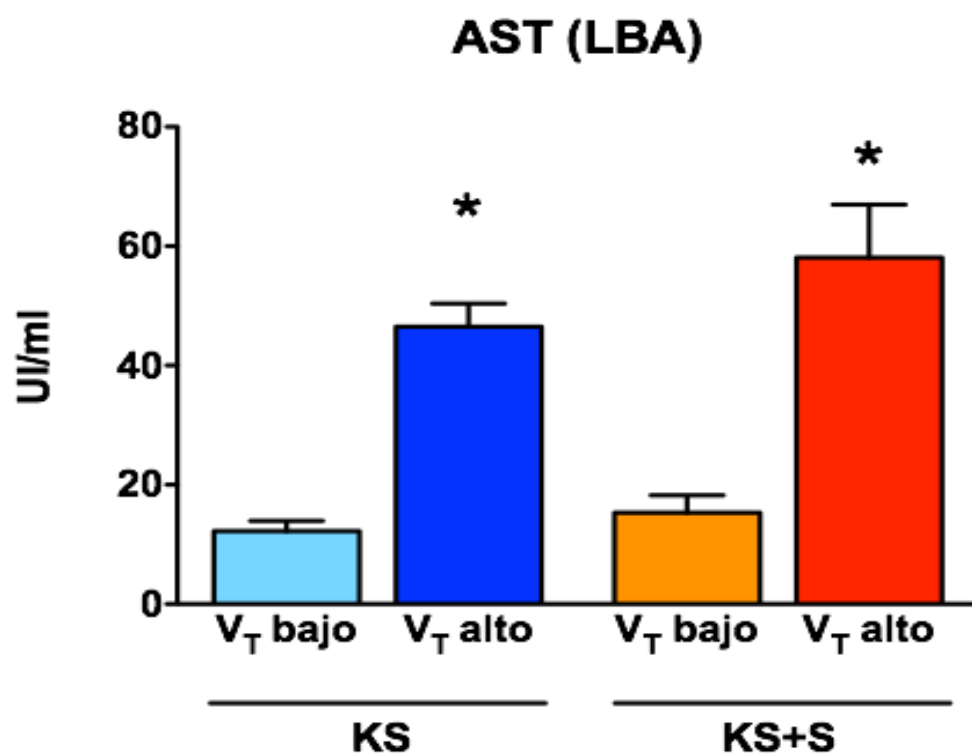
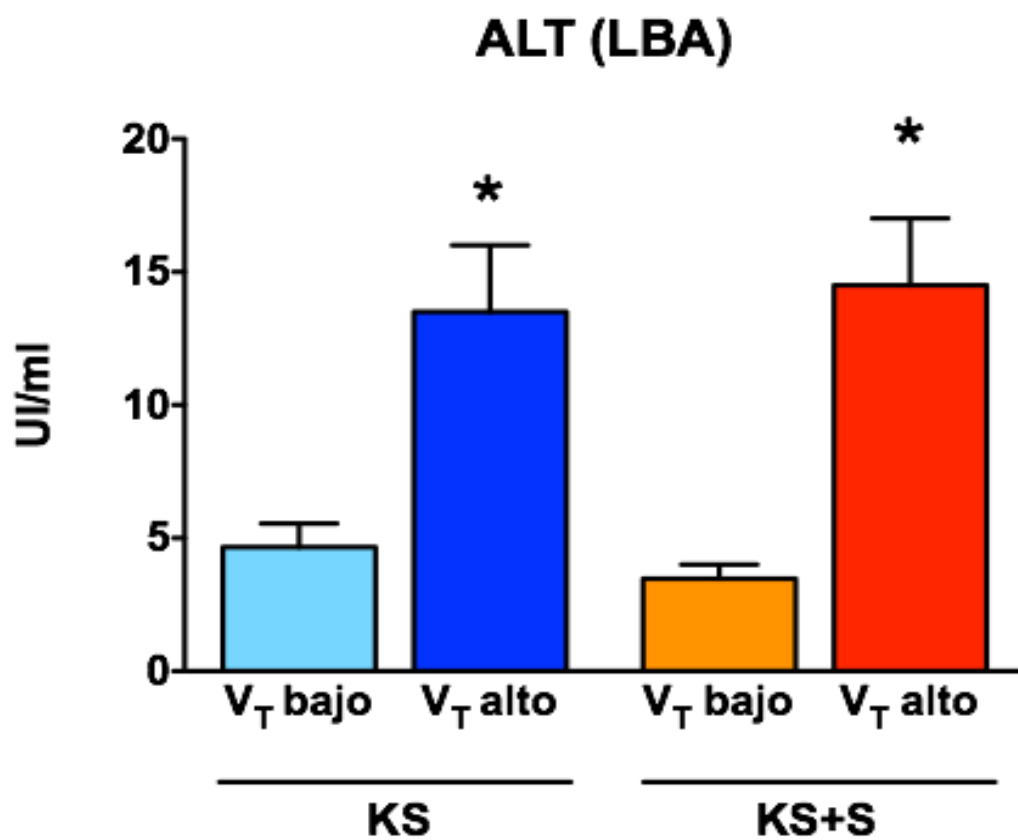
8.5.1. LBA

En pulmones perfundidos con KS, la administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) se asoció con una mayor actividad de ALT ($p=0,034$), AST ($p=0,002$) y LDH ($p=0,0008$).

En pulmones perfundidos con KS+S, la administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) también se asoció con una mayor actividad de ALT ($p=0,005$), AST ($p=0,0038$) y LDH ($p<0,0001$).

En pulmones ventilados con V_T bajo, la actividad de ALT ($p=0,27$), AST ($p=0,39$) y LDH ($p=0,98$) era similar en KS que en KS+S.

En pulmones ventilados con V_T alto, la actividad de ALT ($p=0,78$) y AST ($p=0,28$) era similar en KS que en KS+S, mientras que la actividad de LDH era mayor en KS+S que en KS ($p=0,036$) (Fig. 36, Tabla 6).



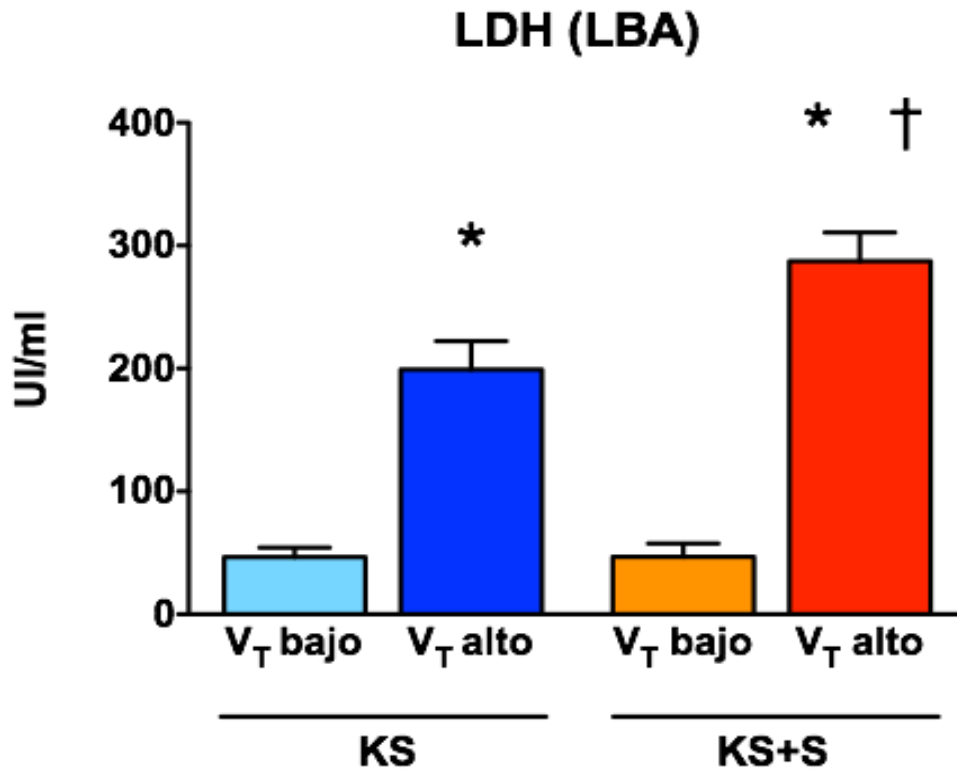


Figura 36. Concentración de proteínas en el líquido de perfusión en los diferentes grupos. La VM utilizando VT elevado, en comparación con VT bajo, no cambió la concentración de proteínas en el líquido de perfusión. La perfusión con elementos sanguíneos en el líquido de perfusión se asoció con una mayor concentración de proteínas en el líquido de perfusión. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media±EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo. (†) $p < 0,05$ versus KS.

		KS		KS+S	
		V _T bajo	V _T elevado	V _T bajo	V _T elevado
LBA					
ALT		4,7±0,9	13,5±2,5 *	3,5± 0,5	14,5± 2,5 *
AST		12,3±1,9	46,5±3,9 *	15,3±2,9	58,1±8,9 *
LDH		46,5±7,8	199,3±23,0 *	46,8±10,8	287,3±23,3 *†
Líquido de perfusión					
ALT		6,5±0,3	7,7±0,9	7,3±0,8	19,8±1,9 *†
AST		8,0±1,6	48,3±3,7 *	38,8±5,0 †	108,8±9,4 *†
LDH		47,0±5,7	110,2±18,3 *	485,5±61,4 †	782,3±47,2 *†
Ratio (¶)					
ALT		0,8±0,1	1,7±0,2 *	0,5±0,1	0,8±0,2 †
AST		1,6±0,2	1,0±0,1 *	0,4±0,1 †	0,5±0,1 †
LDH		1,1±0,3	2,0±0,3	0,1±0,0 †	0,4±0,0 *†

Tabla 6: Actividad de diferentes enzimas en LBA, líquido de perfusión y su ratio, KS, solución de Krebs, KS+S: solución de Krebs con elementos sanguíneos, LBA, lavado broncoalveolar, (¶) Ratio de la actividad de los diferentes enzimas LBA / líquido de perfusión, (*) $p < 0,05$ versus VT bajo, (†) $p < 0,05$ versus KS, Los valores se ofrecen en UI/ml, Los valores son media \pm EEM.

8.5.2. Líquido de perfusión

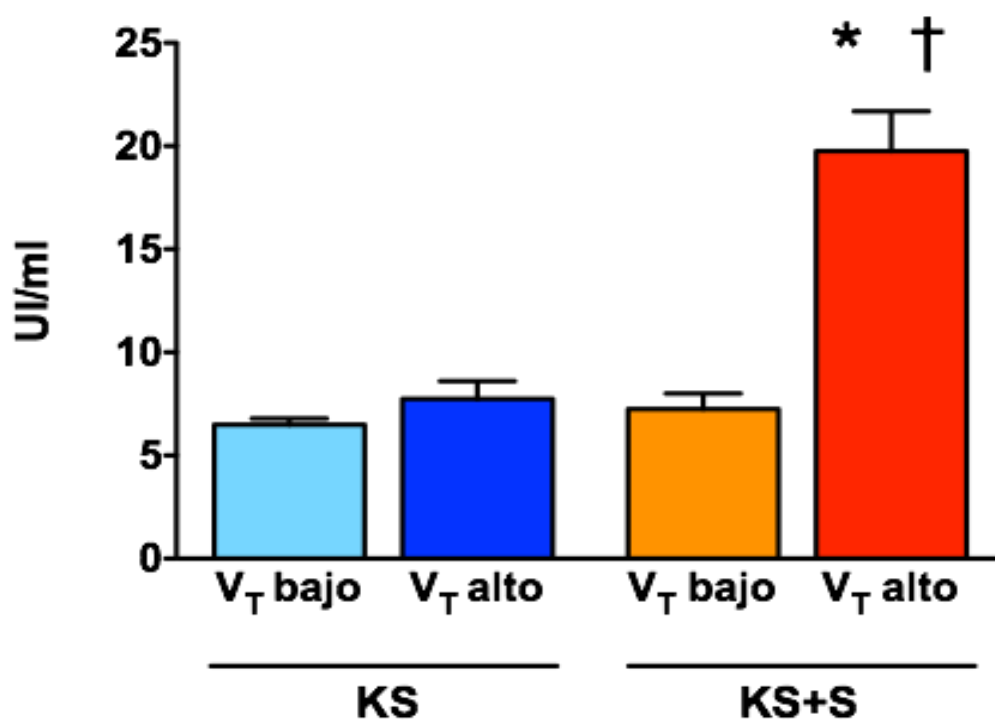
La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS se asoció con una elevación de AST ($p < 0,0001$) y de LDH ($p = 0,016$) pero no de ALT ($p = 0,21$).

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS+S se asoció con una elevación de ALT ($p = 0,0009$), AST ($p < 0,0006$) y de LDH ($p = 0,009$).

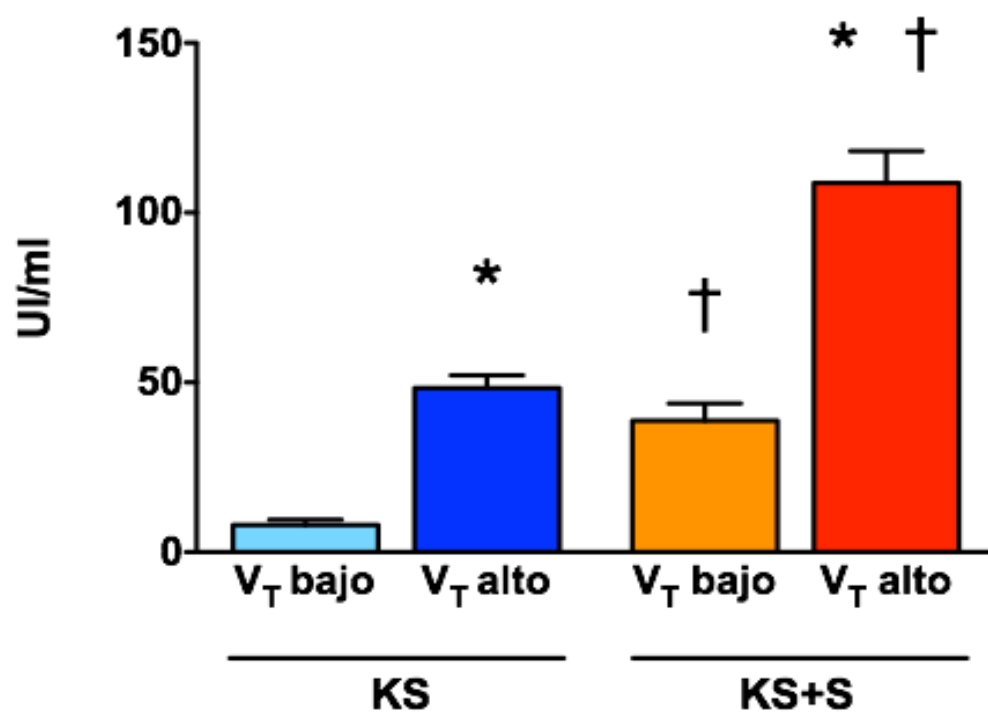
En pulmones ventilados con V_T bajo, la elevación de ALT fue de igual magnitud en KS que en KS+S ($p = 0,39$), pero la elevación de AST ($p = 0,0011$) y de LDH ($p = 0,0004$) fue mayor en KS+S que en KS.

En pulmones ventilados con V_T alto, la elevación de ALT ($p = 0,001$), AST ($p = 0,003$) y de LDH ($p < 0,0001$) fue mayor en KS+S que en KS (Fig. 37, Tabla 6).

ALT (líquido de perfusión)



AST (líquido de perfusión)



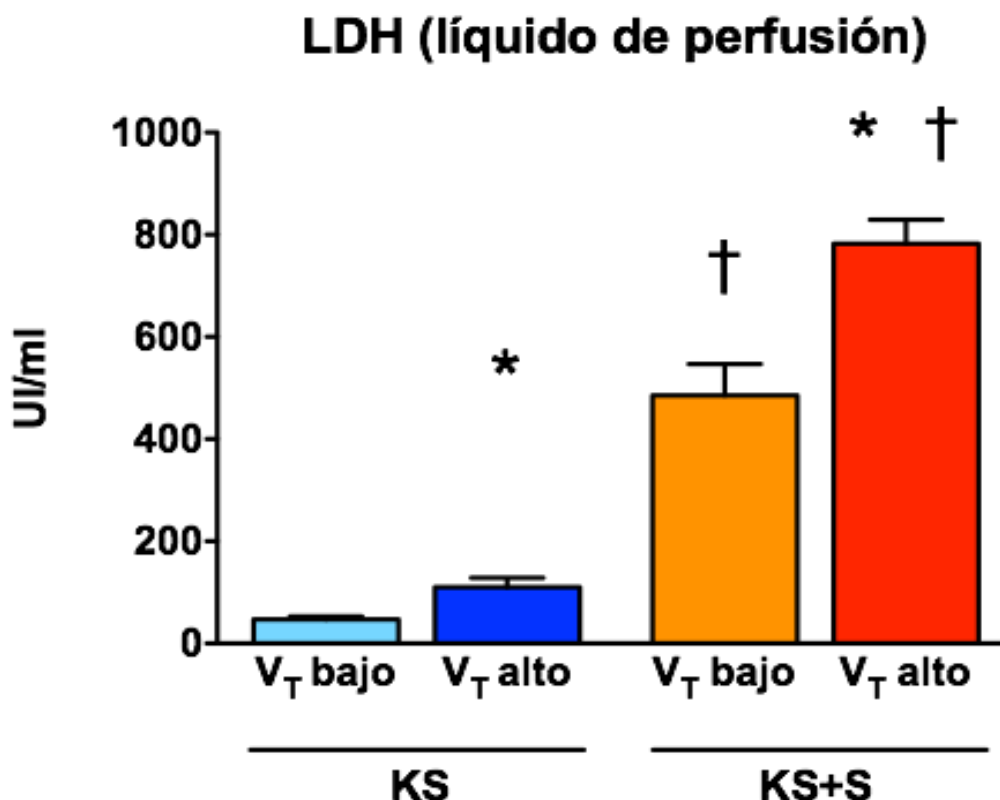


Figura 37. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la actividad de la ALT, AST y LDH en el líquido de perfusión. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media±EEM. KS. (*) $p<0,05$ versus VT bajo. (†) $p<0,05$ versus KS.

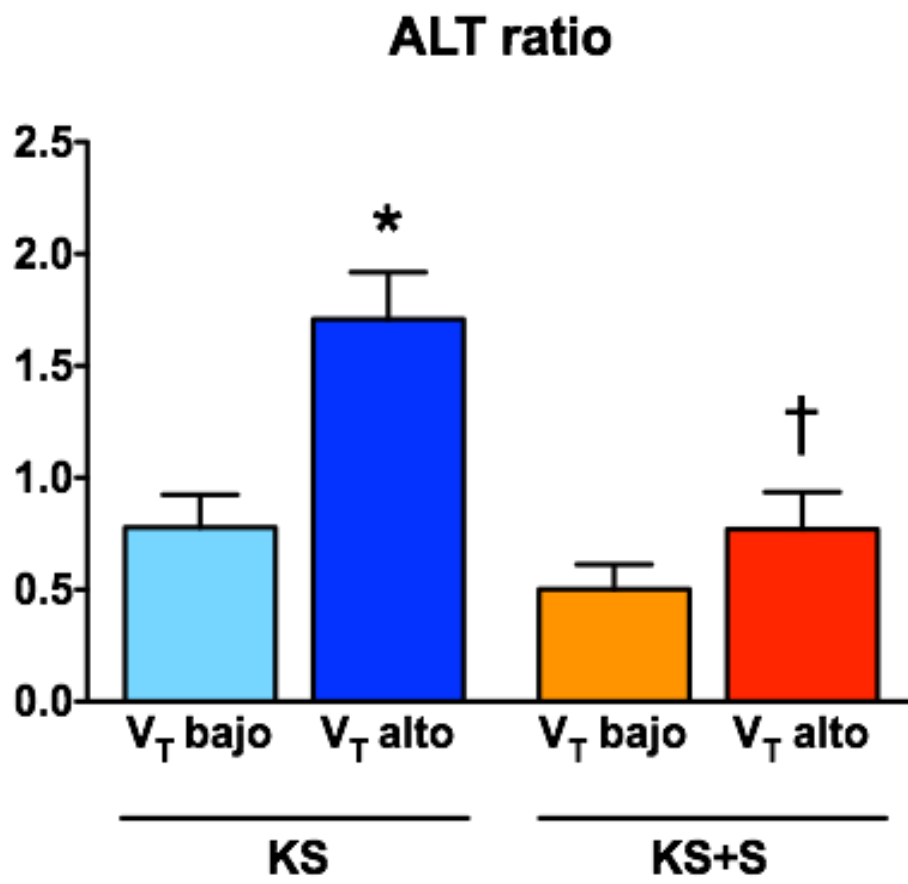
8.5.3. Ratio LBA / líquido de perfusión

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS se asoció con una elevación de la ratio de ALT ($p=0,02$) una disminución de la ratio de AST ($p=0,045$) y un aumento no significativo de la ratio de LDH ($p=0,09$).

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS+S no se asoció con cambios en la ratio de ALT ($p=0,23$), AST ($p=0,46$), pero sí con un aumento significativo de la ratio de LDH ($p=0,002$).

En pulmones ventilados con V_T bajo, la ratio de ALT fue de igual magnitud en KS que en KS+S ($p=0,19$), pero las ratios de AST ($p=0,0013$) y de LDH ($p=0,02$) fueron menores KS+S que en KS.

En pulmones ventilados con V_T alto, la ratio de ALT ($p=0,01$), AST ($p=0,018$) y de LDH ($p=0,003$) fue menor en KS+S que en KS (Fig. 38, Tabla 6).



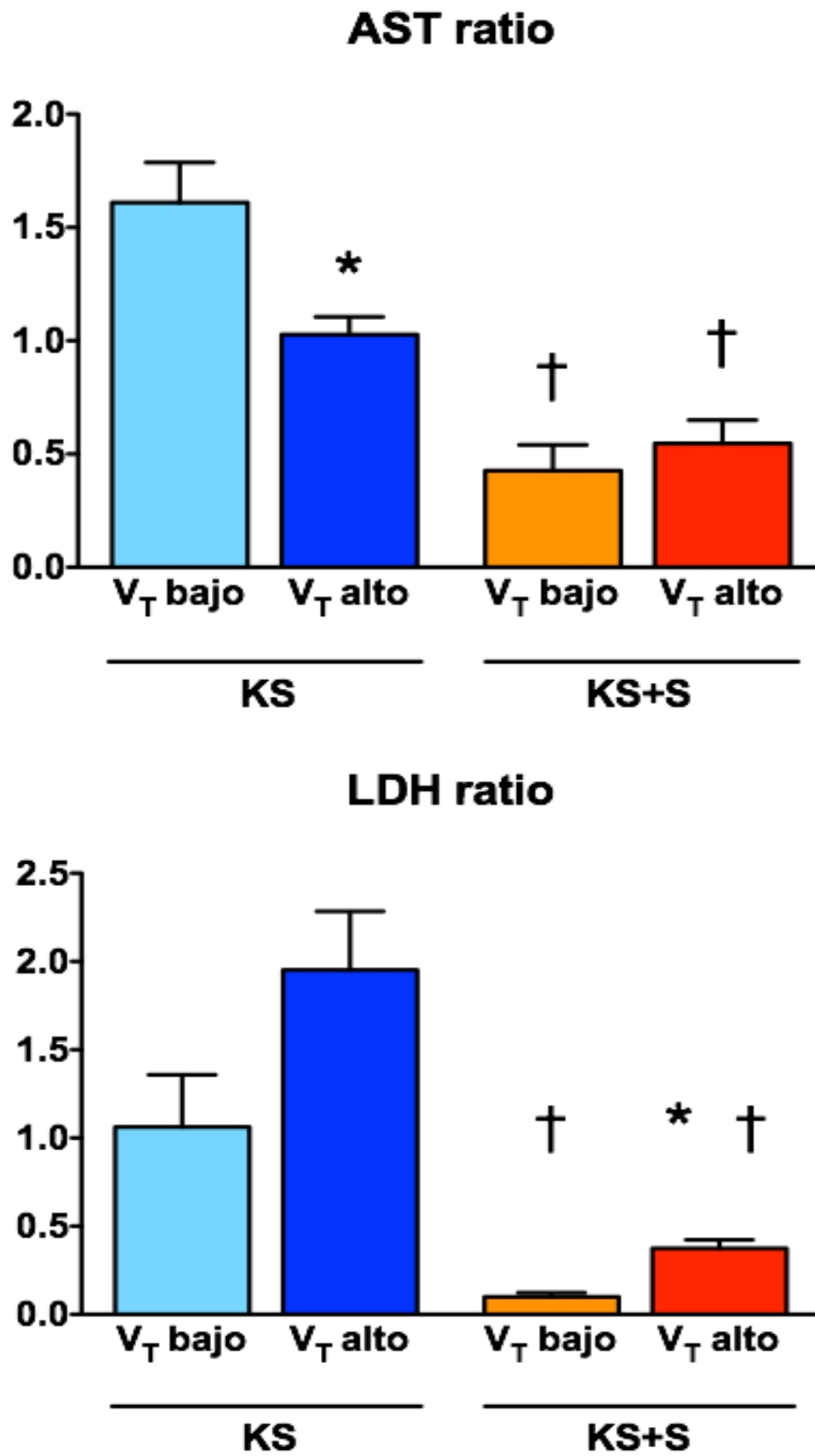


Figura 38. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en el cociente LBA/líquido de perfusión de la actividad de ALT, AST y LDH. KS, solución de

Resultados

Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media \pm EEM. (*) $p<0,05$ versus VT bajo. (†) $p<0,05$ versus KS.

En resumen, se muestra una elevación de la actividad de ALT, AST y LDH en LBA asociada a la administración de V_T elevado, que es ligeramente más marcada en el grupo perfundido con KS+S que en el grupo perfundidos con KS.

En el líquido de perfusión, en los pulmones sometidos a ventilación con V_T bajo la actividad enzimática de AST y LDH (pero no ALT) es mayor en los pulmones perfundidos con elementos sanguíneos que en los pulmones perfundidos con KS.

Al aplicar VM con V_T elevado, la actividad de AST, ALT y LDH en el líquido de perfusión aumenta (en comparación con pulmones sometidos a ventilación con V_T bajo) más marcadamente en los pulmones perfundidos con KS+S que en los pulmones perfundidos con KS.

Los resultados descritos serán discutidos en detalle en la sección de Discusión.

8.6. Equilibrio ácido-base

Con el objeto de determinar si la composición del líquido de perfusión (sin y con elementos sanguíneos: KS y KS+S, respectivamente) producía cambios en el equilibrio ácido base, se midió el pH, pCO_2 , pO_2 , bicarbonato, exceso de bases, hematocrito y lactato en el líquido de perfusión.

No se encontraron diferencias en las variables analizadas entre los diferentes grupos en $T=0$ min ni en $T=150$ min (Tabla 7).

Resultados

	KS				KS+S			
	V _T bajo		V _T elevado		V _T bajo		V _T elevado	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
pH	7,40±0,00	7,40±0,10	7,43±0,04	7,34±0,04	7,50±0,10	7,40±0,0	7,40±0,10	7,32±0,05
pCO ₂ (mmHg)	23,6±1,1	22,6±1,2	23,9±1	22±1,5	29±1,0	28±1,8	30,2±1,7	28,4±1,9
pO ₂ (mmHg)	164±2	162±2	165±4	168±5	166±4	170±2	163±2	164±2
HCO ₃ (mmol)	15,7±1,7	13,4±1,5	16,1±1,4	12,2±1,4	21,1±2,6	15,9±1,6	21,0±2,9	14,4±1,4
EB (mmol)	-8,8±2,2	-11,9±2,4	-8,3±2	-13,5±2	-2,7±3,4	-9,6±2,1	-3,1±3,7	-11,9±1,9
Hematocrito	-	0,1±0	-	0,1±0	10,6±0,8	8,5±0,2	10,6±0,5	9,5±0,3
Lactato	0,2±0	0,8±0,1	0,2±0	1,8±0,1	0,9±0,1	2,1±0,1	0,9±0,1	3,2±0,1

Tabla 7: Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en el equilibrio ácido base, hematocrito y concentración sanguínea de lactato. Los valores son media ± EEM. KS: solución de Krebs. KS+S: solución de Krebs con elementos sanguíneos. (*) p<0,05 versus VT bajo. (†) p<0,05 versus KS.

8.7. Inflamación pulmonar

8.7.1. Concentración de citoquinas

Con el fin de determinar el efecto de la composición del líquido de perfusión en los cambios inducidos por la VM en la respuesta inflamatoria pulmonar, se determinó la concentración de citoquinas en muestras de tejido pulmonar procedente de pulmones sometidos a VM con V_T elevado o V_T bajo, comparando los cambios en pulmones perfundidos con KS o con KS+S.

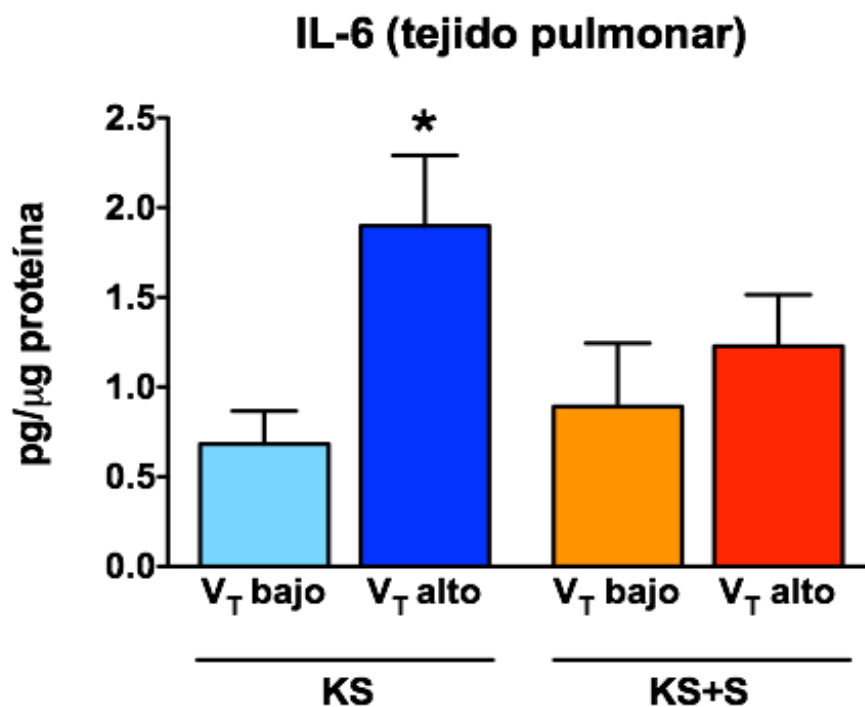
La perfusión con KS+S (en comparación con KS) en pulmones ventilados con V_T bajo se asoció con similar concentración de IL-6 (p=0,60), IL-10 (p=0,75), y IL1β (p=0,87), y una menor concentración de MCP-1 (p=0,036) y (sin alcanzar la significación estadística) de MIP-2 (p=0,07).

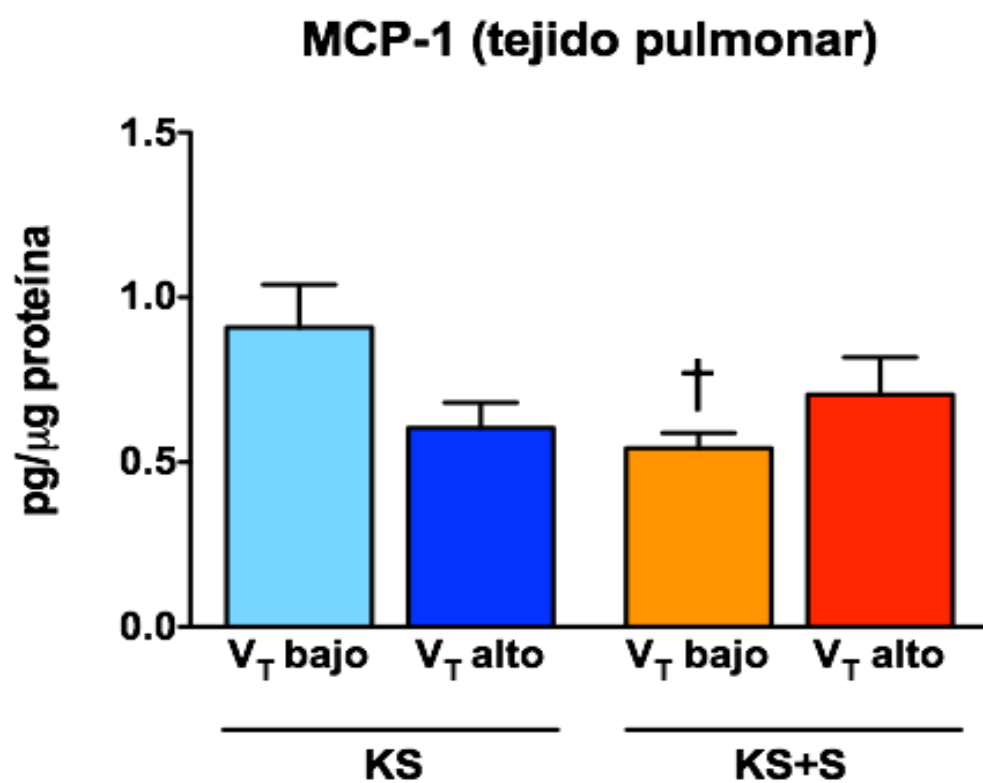
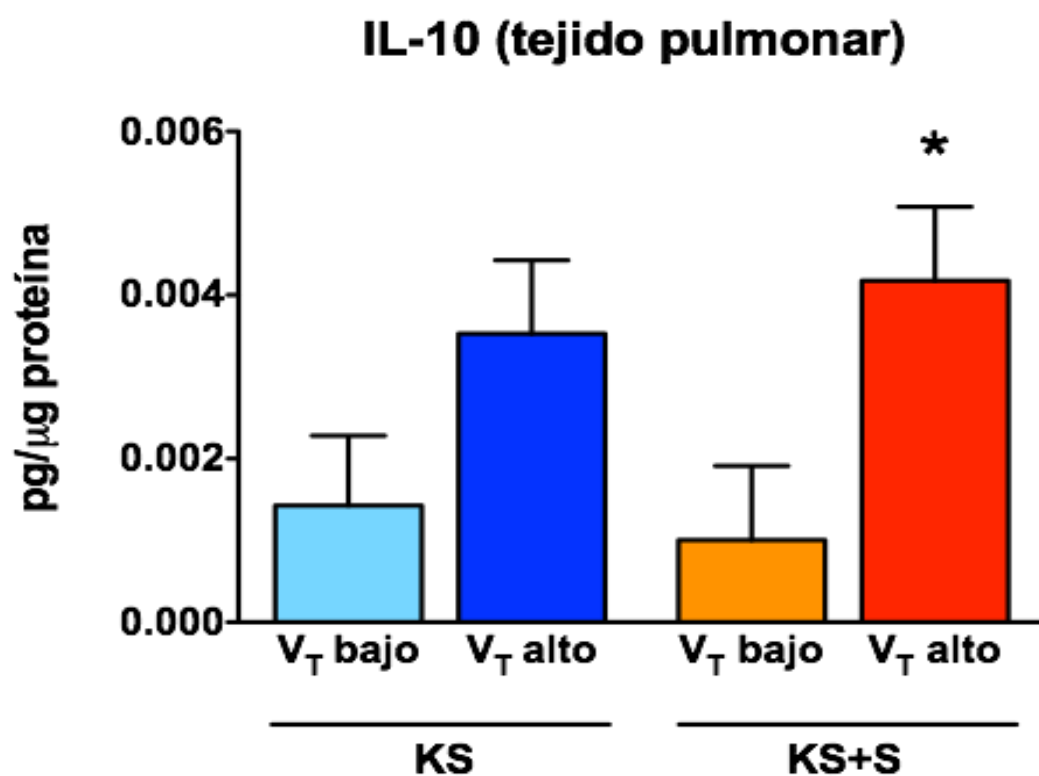
Resultados

La administración de VT elevado (en comparación con VT bajo) en pulmones perfundidos con KS+S se asoció con una elevación de IL-10 ($p=0,045$), sin cambios apreciables en la concentración de IL-6 ($p=0,47$), MCP-1 ($p=0,27$), MIP-2 ($p=0,44$), IL1 β ($p=0,43$).

La perfusión con KS+S (en comparación con KS) en pulmones ventilados con V_T elevado se asoció con similar concentración de IL-6 ($p=0,22$), IL-10 ($p=0,63$), MCP-1 ($p=0,48$), MIP-2 ($p=0,60$) e IL1 β ($p=0,26$) (Fig. 39, Tabla 8).

Estos hallazgos sugieren un efecto de la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión consistente en una atenuación de la respuesta pro-inflamatoria inducida por la VM (menor concentración de IL-6 y de MCP-1) y un aumento de la respuesta anti-inflamatoria (mayor elevación de IL-10).





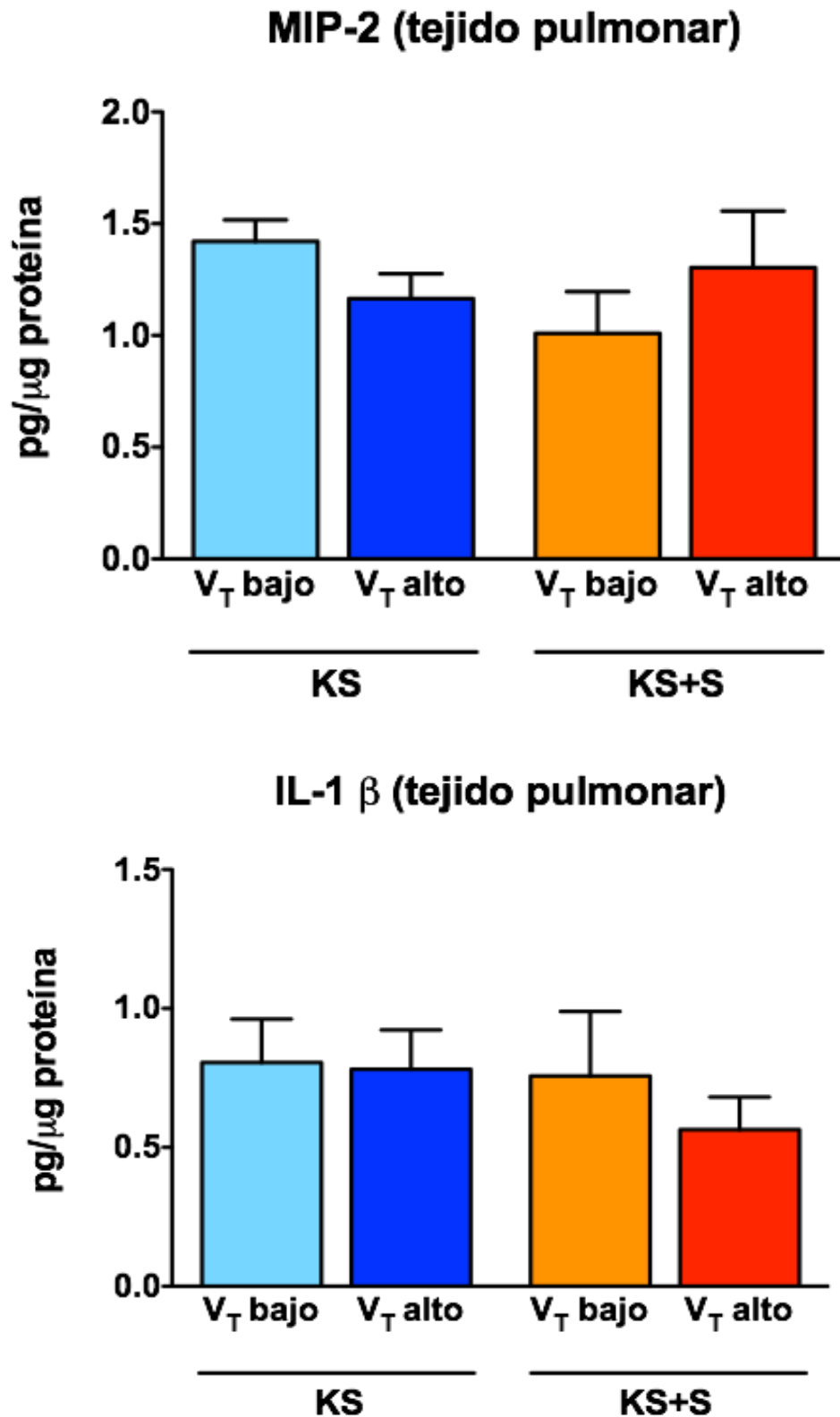


Figura 39. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la concentración de citoquinas en el tejido pulmonar. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media±EEM. (*) $p < 0,05$ versus VT bajo. (†) $p < 0,05$ versus KS.

8.7.2. Expresión Génica

Se midió la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta inflamatoria (RT-qPCR).

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS se asoció (con diferentes grados de significación) con una elevación de la expresión génica de IL-6 ($p=0,11$), IL-10 ($p=0,32$), MCP-1 ($p=0,02$) MIP-2 ($p=0,02$) y TNF α ($p=0,31$).

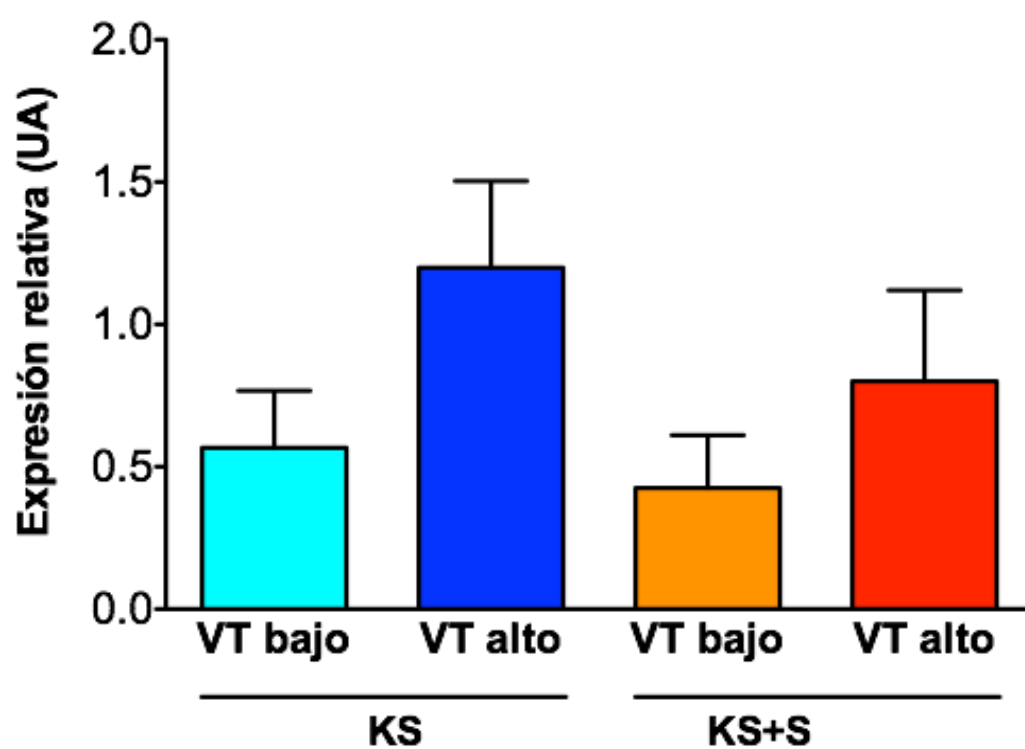
La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS+S se asoció con una discreta (sin alcanzar la significación estadística) elevación de la expresión génica de IL-6 ($p=0,30$) y MIP-2 ($p=0,07$), sin cambios apreciables (entre V_T bajo y V_T elevado) en la expresión génica de IL-10 ($p=0,44$), MCP-1 ($p=0,61$), TNF α ($p=0,20$).

La perfusión con KS+S (en comparación con KS) en pulmones ventilados con V_T bajo se asoció con similar expresión génica de IL-6 ($p=0,61$), IL-10 ($p=0,77$), MCP-1 ($p=0,53$), MIP-2 ($p=0,29$) y TNF α ($p=0,21$).

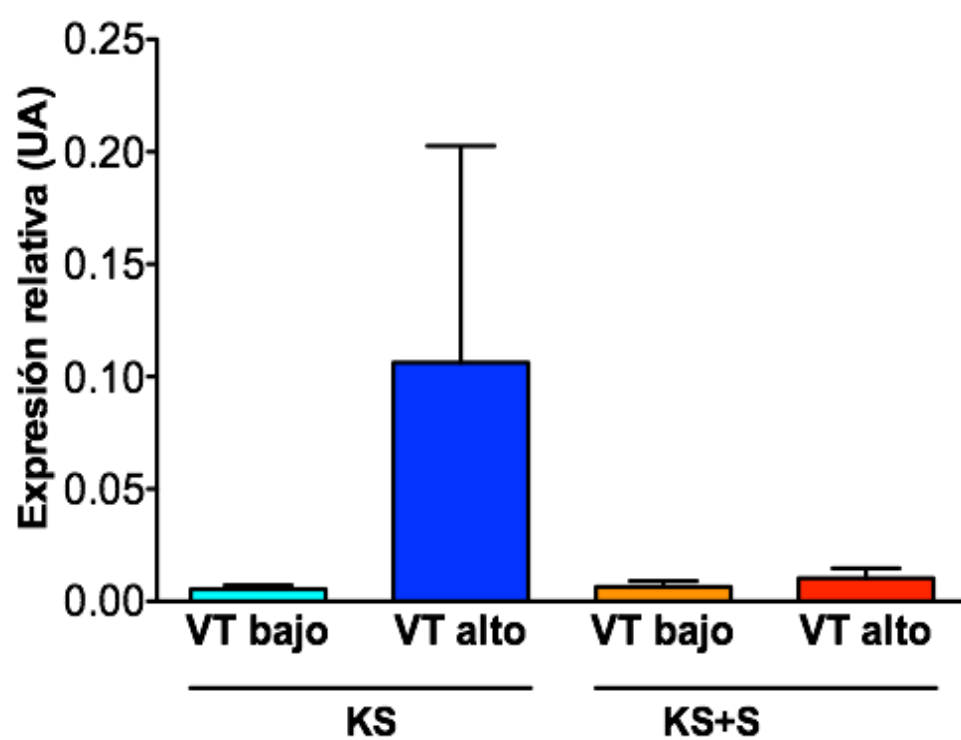
La perfusión con KS+S (en comparación con KS) en pulmones ventilados con V_T elevado se asoció con una menor expresión génica de IL-6 ($p=0,40$), IL-10 ($p=0,43$), MCP-1 ($p=0,03$), MIP-2 ($p=0,09$) y TNF α ($p=0,40$) (alcanzando la significación estadística sólo para el caso de MCP-1) (Fig. 40, Tabla 8).

Así, pues, la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión de los pulmones ventilados *ex vivo* se asocia con una menor respuesta inflamatoria a la administración de V_T elevado.

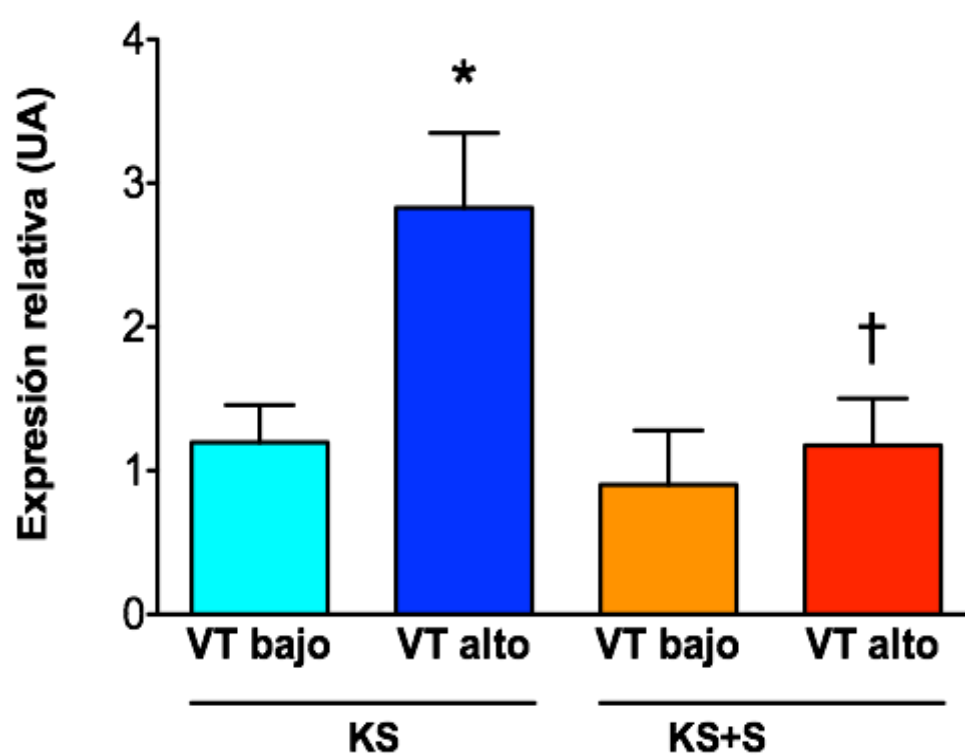
Expresión de IL-6 (tejido pulmonar)



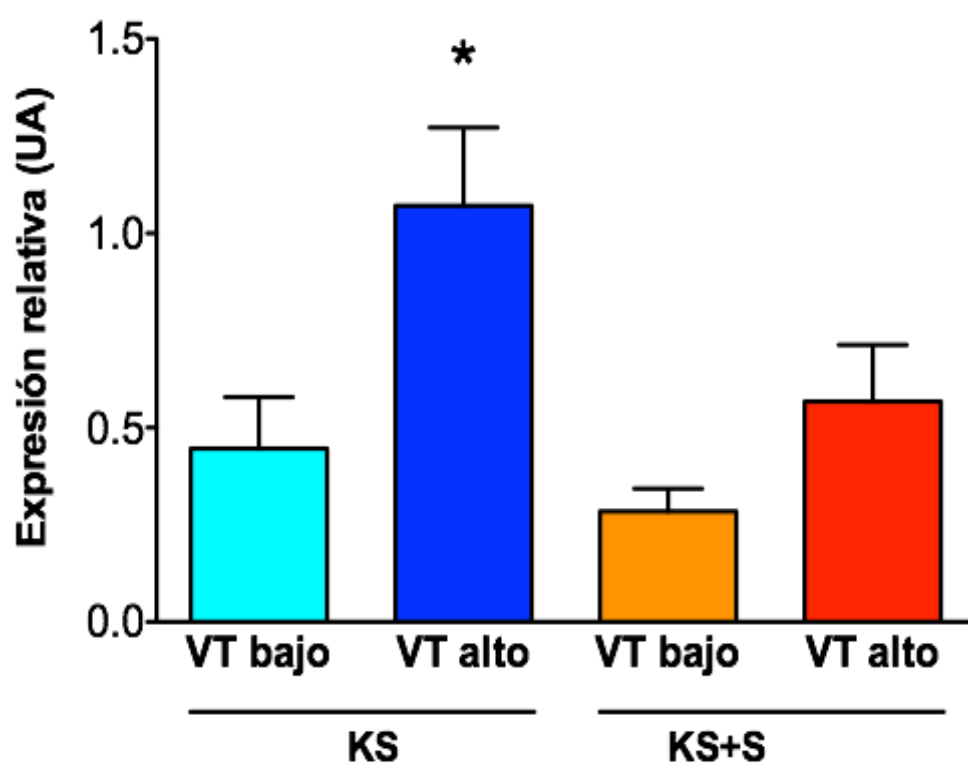
Expresión de IL-10 (tejido pulmonar)



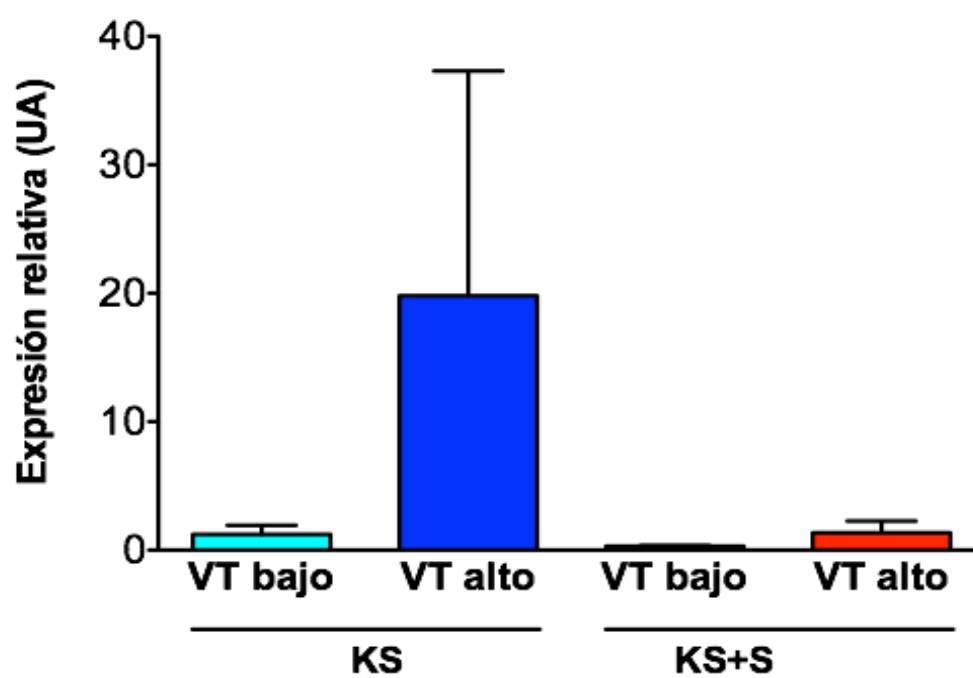
Expresión de MCP-1 (tejido pulmonar)



Expresión de MIP-2 (tejido pulmonar)



Expresión de TNF- α (tejido pulmonar)



Resultados

Figura 40. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la expresión génica en el tejido pulmonar. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media±EEM. (*) p<0,05 versus VT bajo. (†) p<0,05 versus KS

		KS		KS+S	
		V _T bajo	V _T elevado	V _T bajo	V _T elevado
LBA					
ALT		4,7±0,9	13,5±2,5 *	3,5± 0,5	14,5± 2,5 *
AST		12,3±1,9	46,5±3,9 *	15,3±2,9	58,1±8,9 *
LDH		46,5±7,8	199,3±23,0 *	46,8±10,8	287,3±23,3 *†
Líquido de perfusión					
ALT		6,5±0,3	7,7±0,9	7,3±0,8	19,8±1,9 *†
AST		8,0±1,6	48,3±3,7 *	38,8±5,0 †	108,8±9,4 *†
LDH		47,0±5,7	110,2±18,3 *	485,5±61,4 †	782,3±47,2 *†
Ratio (¶)					
ALT		0,8±0,1	1,7±0,2 *	0,5±0,1	0,8±0,2 †
AST		1,6±0,2	1,0±0,1 *	0,4±0,1 †	0,5±0,1 †
LDH		1,1±0,3	2,0±0,3	0,1±0,0 †	0,4±0,0 *†

Tabla 8: Concentración y expresión génica de diferentes citoquinas en tejido pulmonar. KS, solución de Krebs, KS+S: solución de Krebs con elementos sanguíneos, LBA, lavado broncoalveolar, Los valores se ofrecen en UI/ml, Los valores son media±EEM, (*) p<0,05 versus VT bajo, (†) p<0,05 versus KS.

8.8. Nitración de proteínas

Para determinar la presencia de estrés nitrosativo en el pulmón se cuantificó de forma indirecta la formación de peroxinitrito mediante la determinación de la nitración de proteínas mediante Western-blot e inmunofluorescencia.

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS no se asoció con cambios en la nitración de proteínas (medida por Western blot) (p=0,63).

Resultados

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en pulmones perfundidos con KS+S se asoció con un aumento significativo en la nitración de proteínas (medida por Western blot) ($p=0,002$).

La perfusión con KS+S (en comparación con KS) en pulmones ventilados con V_T bajo se asoció con similar grado de nitración de proteínas (medida por Western blot) ($p=0,14$).

La perfusión con KS+S (en comparación con KS) en pulmones ventilados con V_T elevado se asoció con mayor grado de nitración de proteínas (medida por Western blot) ($p=0,0002$) (Fig. 41, Tabla 5).

Utilizando un segundo abordaje para la determinación del grado de nitración de proteínas, se observó mediante técnicas de inmunofluorescencia un aumento de la nitración de proteínas al aplicar V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en los animales perfundidos con KS+S, mientras que no se encontraron cambios en relación con la aplicación de V_T elevado en los animales perfundidos con KS (Fig. 42).

Por tanto, la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión se asoció con un aumento de la nitración de proteínas al administrar V_T elevado en pulmones ventilados *ex vivo*.

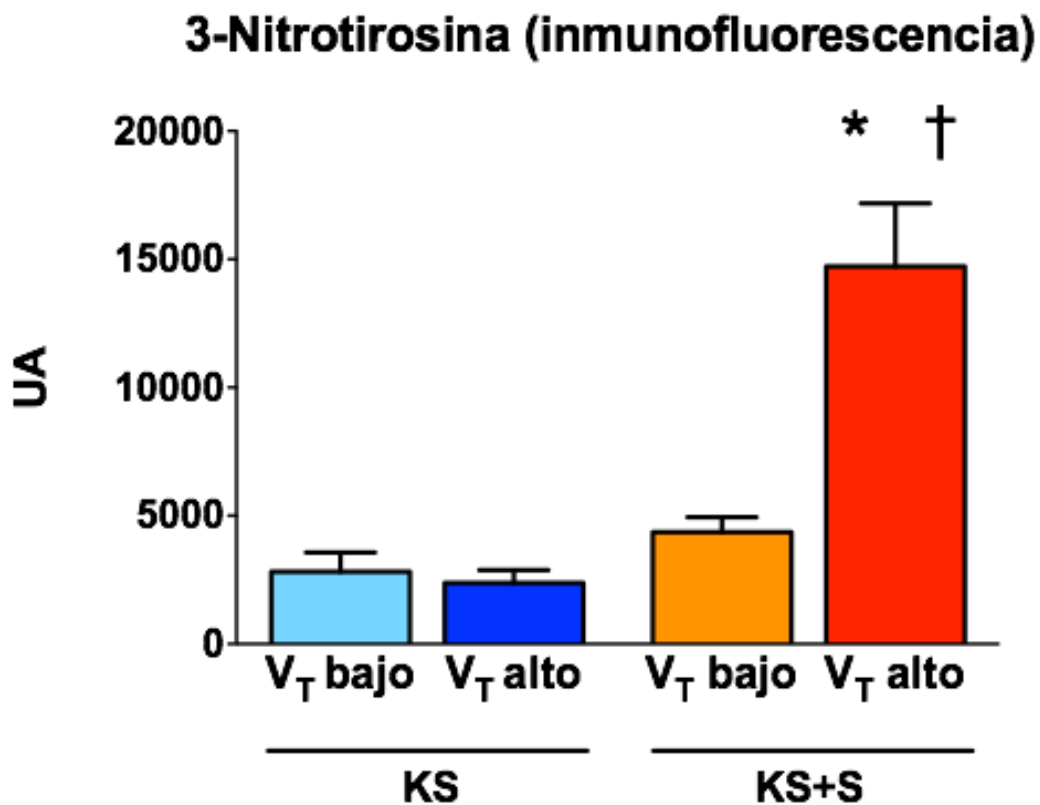


Figura 41. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (Western blot). Sólo los pulmones perfundidos con elementos sanguíneos (KS+S) presentaron un aumento de la nitración de proteínas al administrar VT elevado. KS, solución de Krebs. KS+S, solución de Krebs y elementos sanguíneos. Los valores son media±EEM. (*) $p<0,05$ versus VT bajo. (†) $p<0,05$ versus KS.

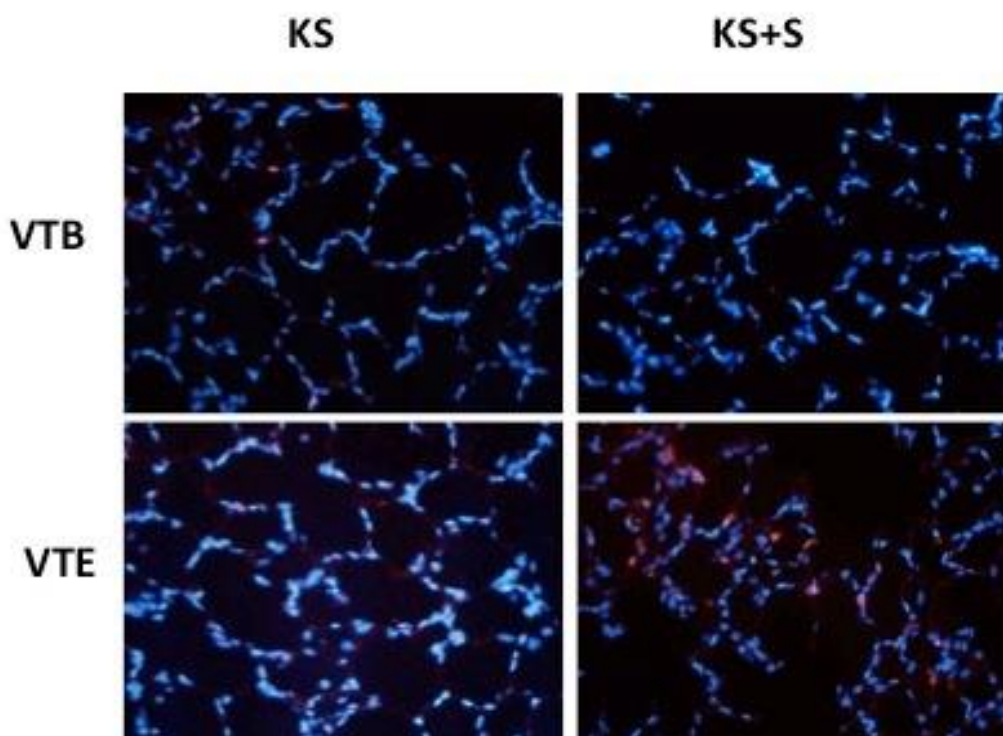


Figura 42. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en la nitración de proteínas en muestras de tejido pulmonar (inmunofluorescencia). Se muestran casos representativos de cortes procedentes de pulmones sometidos a VT elevado o VT bajo, perfundidos bien con KS o bien con KS+S. Sólo el caso sometido a VM con VT elevado y perfundido con KS+S presentó un aumento de la nitración de proteínas, indicando aumento del estrés nitro-oxidativo.

8.9. Estrés oxidativo

Se determinó el grado de estrés oxidativo mediante la técnica de fluorescencia a DHE (ver Métodos).

En ausencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (grupo KS) la aplicación de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) no se asoció con cambios en el estrés oxidativo.

Sin embargo, en presencia de elementos sanguíneos (grupo KS+S), la aplicación de V_T elevado se asoció (en comparación con la aplicación de V_T bajo) con un aumento del estrés oxidativo (Fig. 43).

Por tanto, la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión se asoció con un aumento del estrés oxidativo al administrar V_T elevado en pulmones ventilados *ex vivo*.

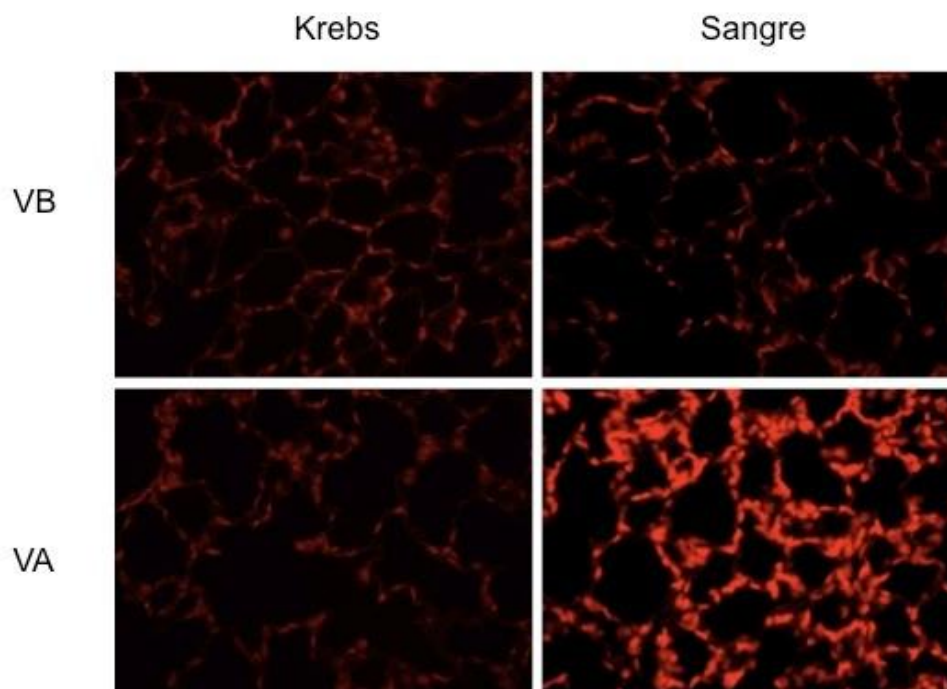


Figura 43. Efecto de la composición del líquido de perfusión sobre los cambios inducidos por la VM en el estrés oxidativo (fluorescencia para DHE) (ver Métodos). Se muestran casos representativos de cortes procedentes de pulmones sometidos a VT elevado o VT bajo, perfundidos bien con KS o bien con KS+S. Sólo el caso sometido a VT.

9. RESULTADOS DEL OBJETIVO 4: DEMOSTRAR QUE EL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA SE ASOCIA CON DISFUNCIÓN EN OTROS ÓRGANOS

El abordaje utilizado para demostrar el efecto de la VM sobre otros órganos no pulmonares fue el diseño de un bioensayo.

Se incubaron durante 30 min o 60 min anillos de aorta (procedentes de ratas normales) con líquido de perfusión procedente de pulmones sometidos bien a V_T bajo (LP-B) o bien a V_T elevado (LP-E), así como con líquido de perfusión que no ha sido circulado por el pulmón (solución de Krebs normal, control). Se estudió la respuesta vascular a diferentes dosis de noradrenalina (NA) y de acetilcolina (Ach) con el fin de analizar la función del músculo liso y del endotelio vascular, respectivamente.

El objetivo es demostrar que el líquido de perfusión procedente de pulmones que han sufrido daño pulmonar inducido por la aplicación de V_T elevado induce disfunción vascular, utilizando como control el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con V_T bajo o líquido de perfusión que no ha circulado por el pulmón.

9.1. Resumen de los resultados

- La respuesta contráctil empeoró tras sólo 30 min de incubación.
- El efecto deletéreo sobre la función contráctil se aprecia con líquido de perfusión procedente de pulmones sometidos a V_T bajo, y no es significativamente mayor en anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado ni con más tiempo de incubación (60 min).
- La respuesta a acetilcolina se encuentra empeorada sólo tras 60 min de incubación con líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con V_T elevado.

Nuestros resultados indican, pues, que el pulmón sometido a VM libera sustancias que causan disfunción tanto del músculo liso como del endotelio. Es suficiente la

ventilación con V_T bajo para liberar sustancias que producen disfunción vascular contráctil.

9.2. Efectos de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la respuesta vascular

9.2.1. Respuestas vasoconstrictoras (Noradrenalina)

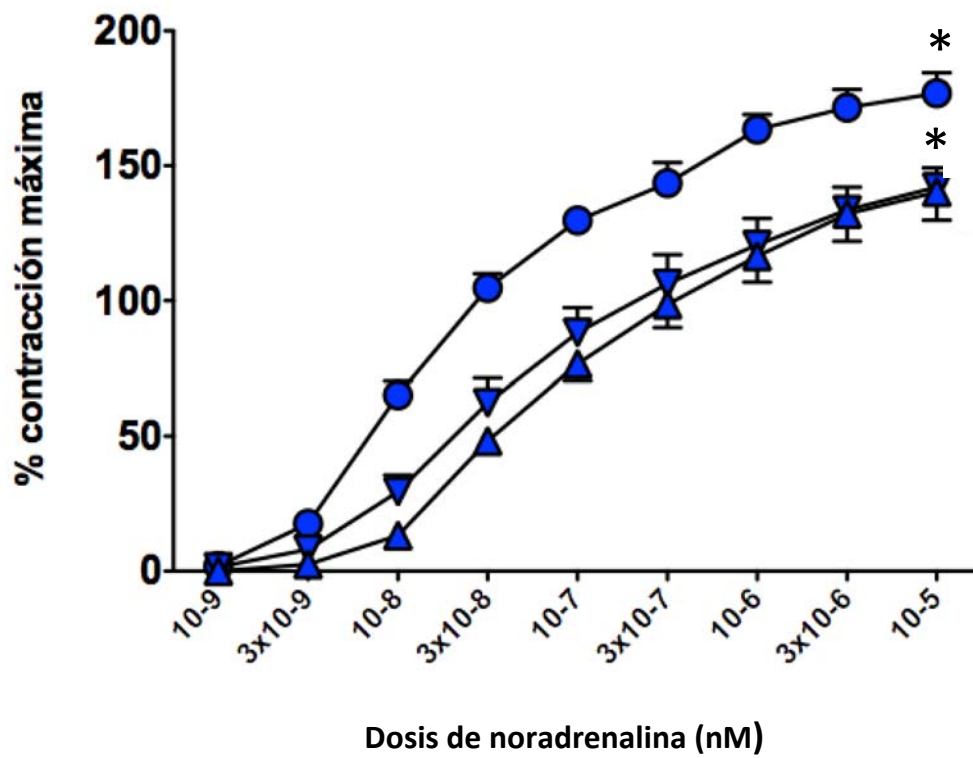
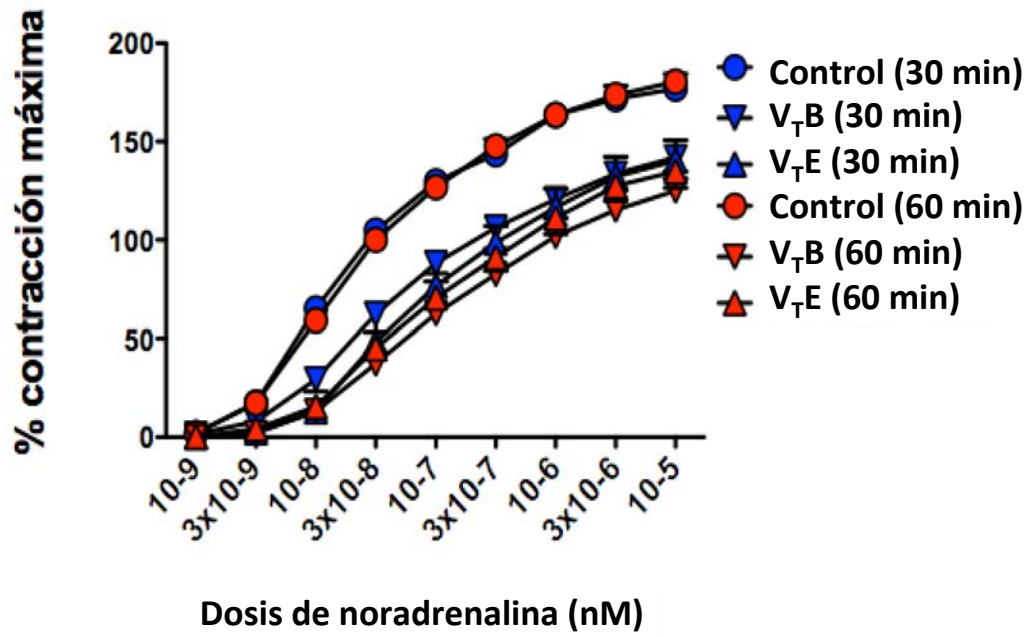
Tras 30 min de incubación, la respuesta a NA de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T bajo ($p=0,005$) y V_T elevado ($p<0,0001$) fue diferente que la respuesta control. La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado y V_T bajo fue similar ($p=1$).

Tras 60 min de incubación, la respuesta a NA de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T bajo ($p<0,0001$) y con V_T elevado ($p<0,0001$) fue diferente que la respuesta control. La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado y líquido de perfusión de V_T bajo fue similar ($p=1$).

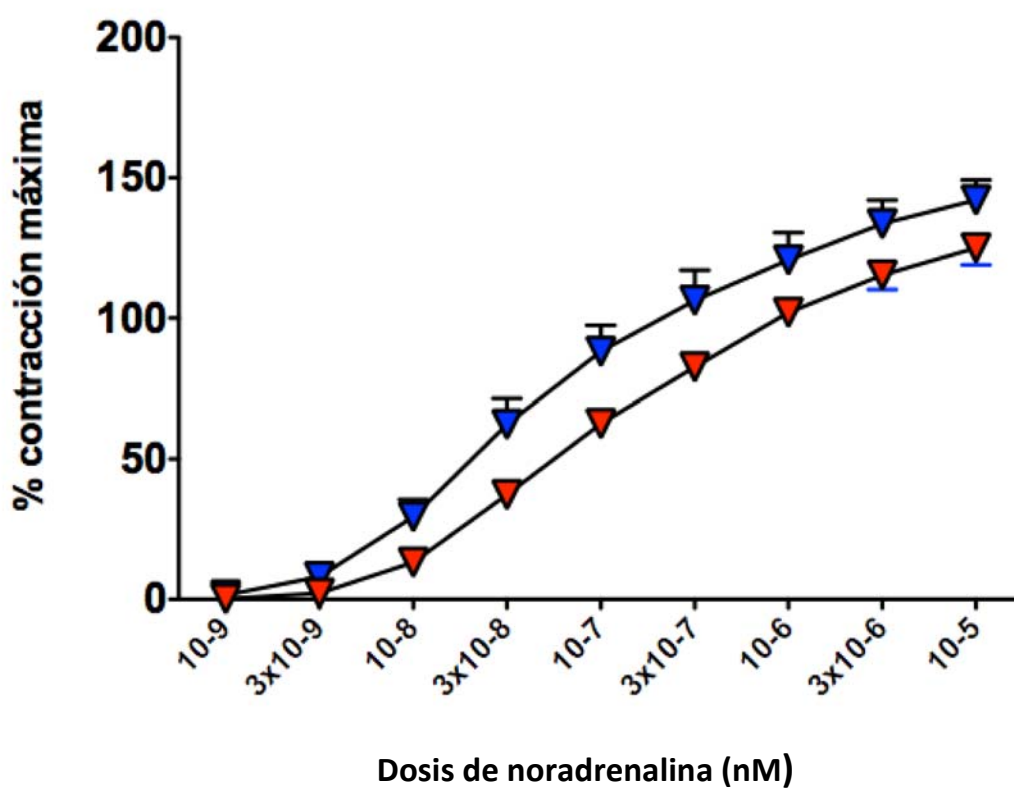
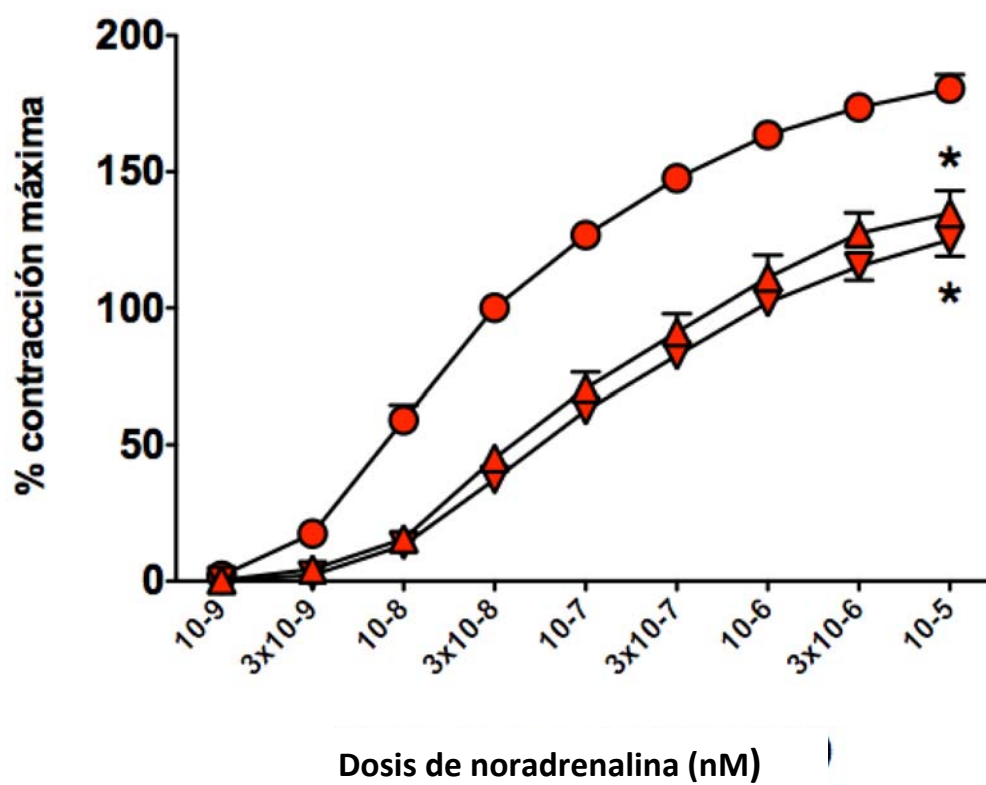
La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T bajo fue similar a los 30 min y a los 60 min ($p=0,60$).

La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado fue similar a los 30 min y a los 60 min ($p=1$) (Fig. 44).

Resultados



Resultados



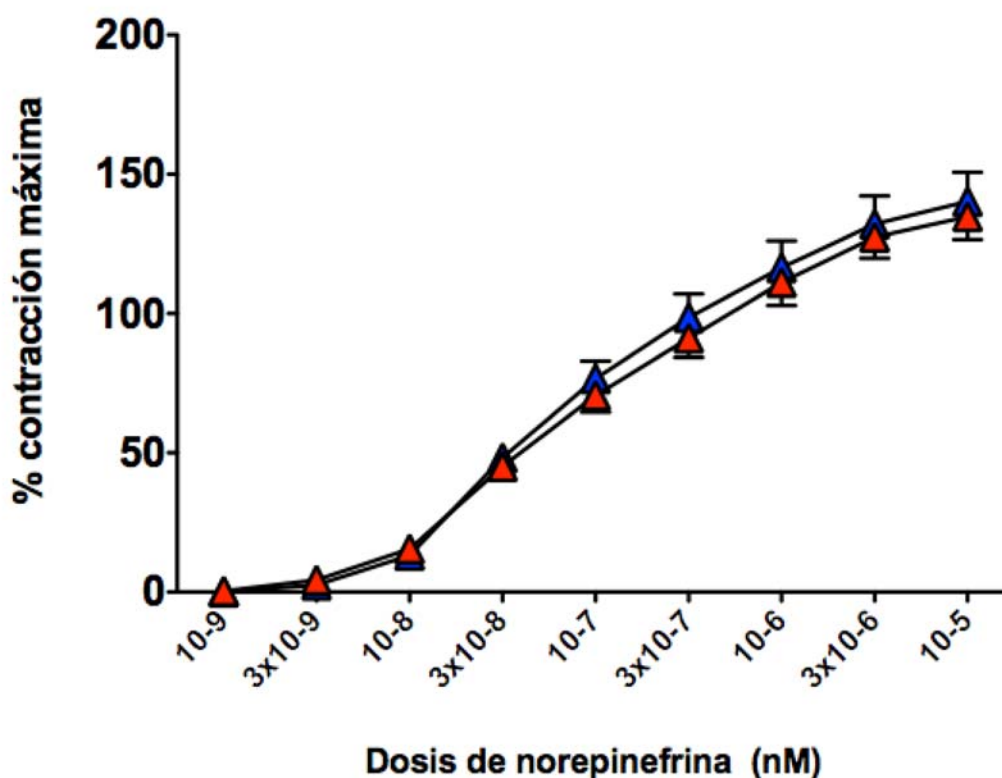


Figura 44. Respuesta vascular contráctil a diferentes dosis de noradrenalina de anillos normales de aorta de rata. Los anillos fueron incubados durante 30 min (símbolos azules) o durante 60 min (símbolos rojos) con líquido de perfusión procedente de animales ventilados con VT bajo (triángulos hacia abajo) o VT elevado (triángulos hacia arriba), o líquido de perfusión no circulado por el pulmón (círculos, grupo control). Los valores son media±EEM. (*) $p < 0,05$ versus control.

9.2.2. Respuestas vasodilatadoras (acetilcolina)

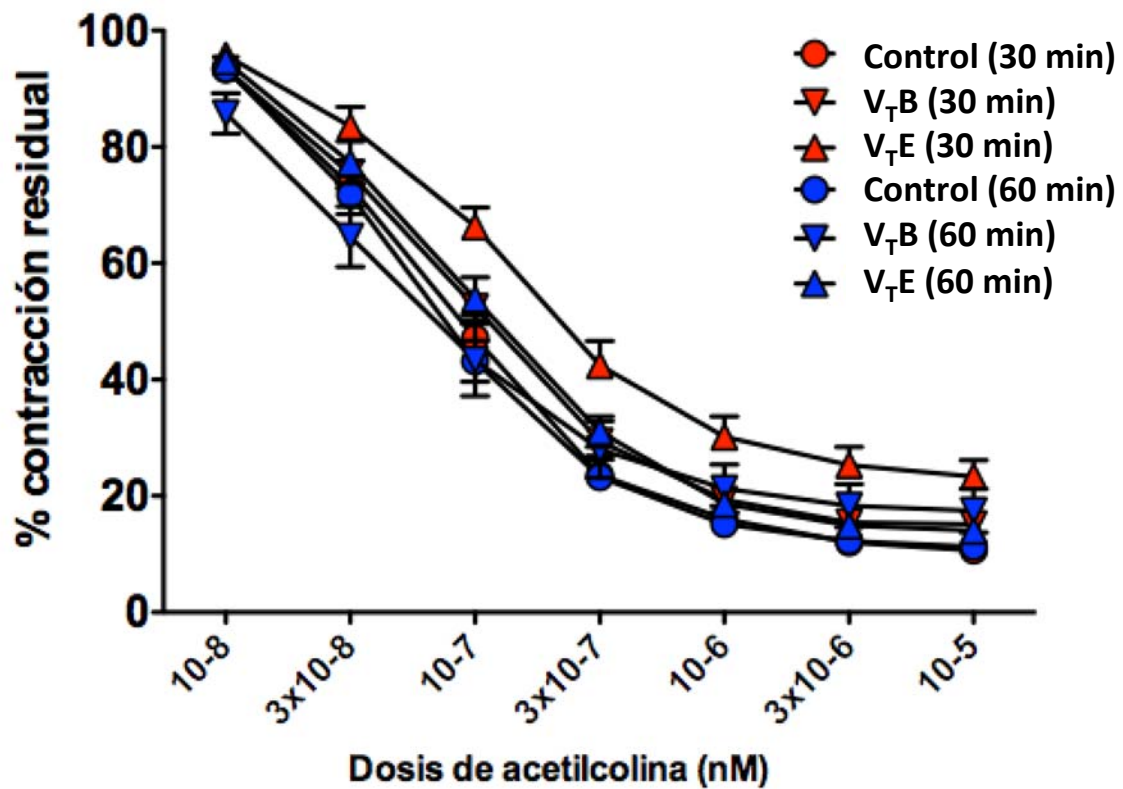
Tras 30 min de incubación, la respuesta a Ach de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T bajo ($p=1$) y V_T elevado ($p=1$) fue similar a la respuesta control. La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado y V_T bajo fue similar ($p=1$).

Tras 60 min de incubación, la respuesta a NA de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T bajo ($p=1$) fue similar a la respuesta control. Sin embargo, la respuesta de anillos de líquido de perfusión con V_T elevado ($p=0,015$) fue diferente que la respuesta control. La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado fue menor (sin alcanzar la significación estadística) que la respuesta de líquido de perfusión de V_T bajo ($p=0,20$).

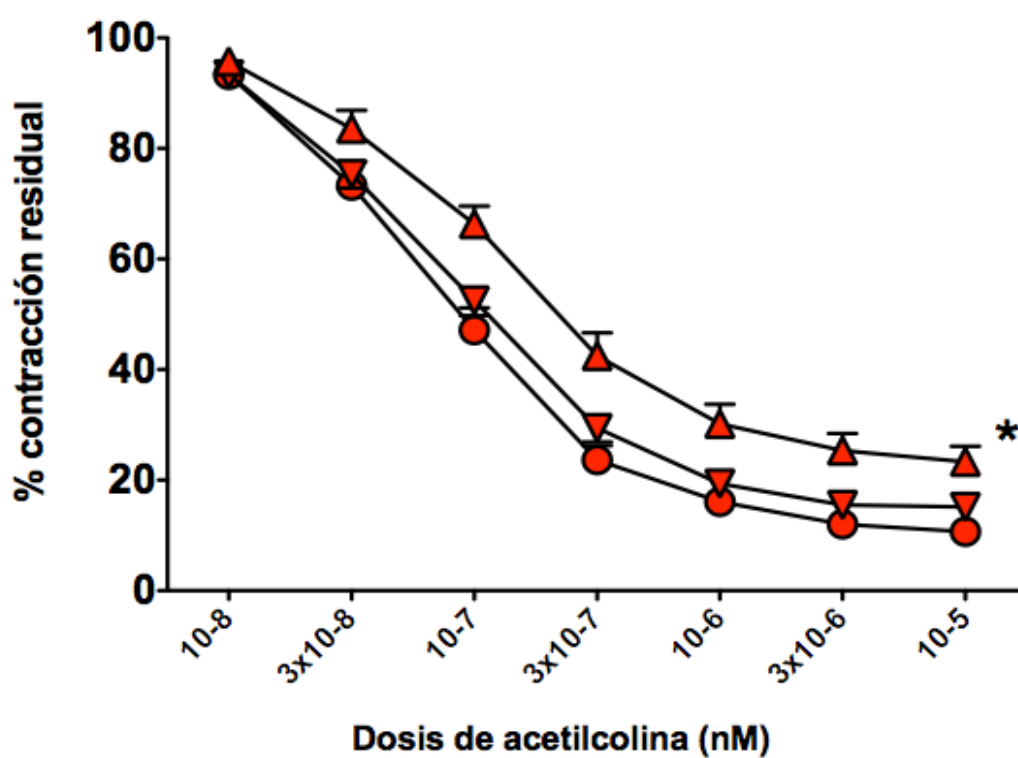
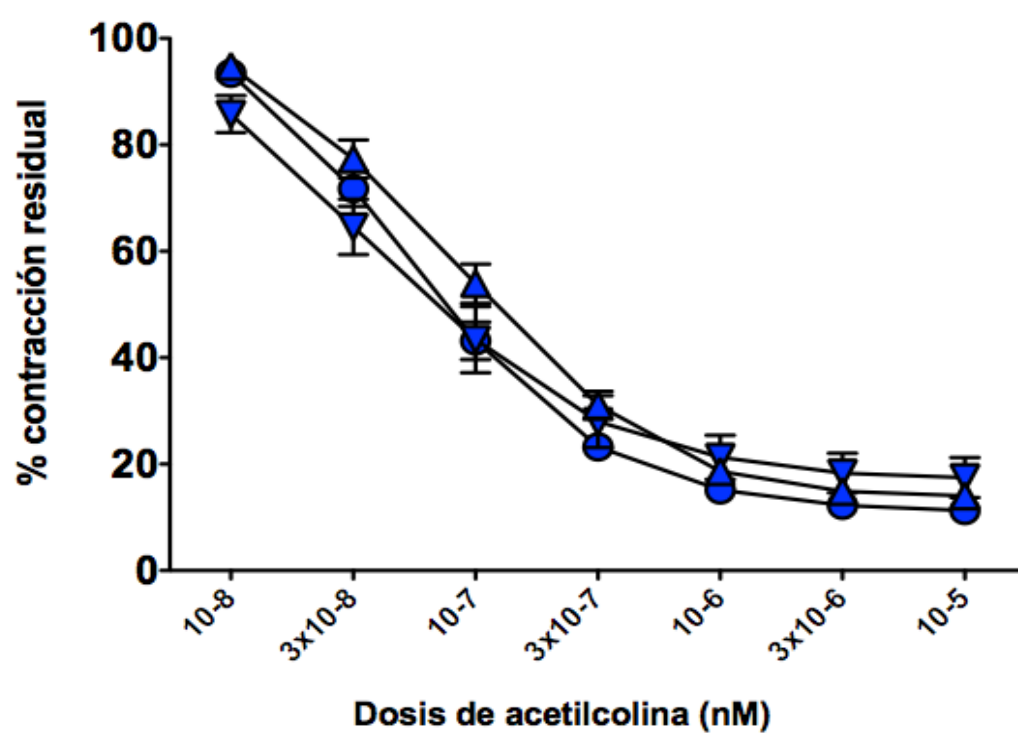
Resultados

La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T bajo fue similar a los 30 min y a los 60 min ($p=1$).

La respuesta de anillos incubados con líquido de perfusión de V_T elevado fue similar a los 30 min y a los 60 min ($p=42$) (Fig. 45).



Resultados



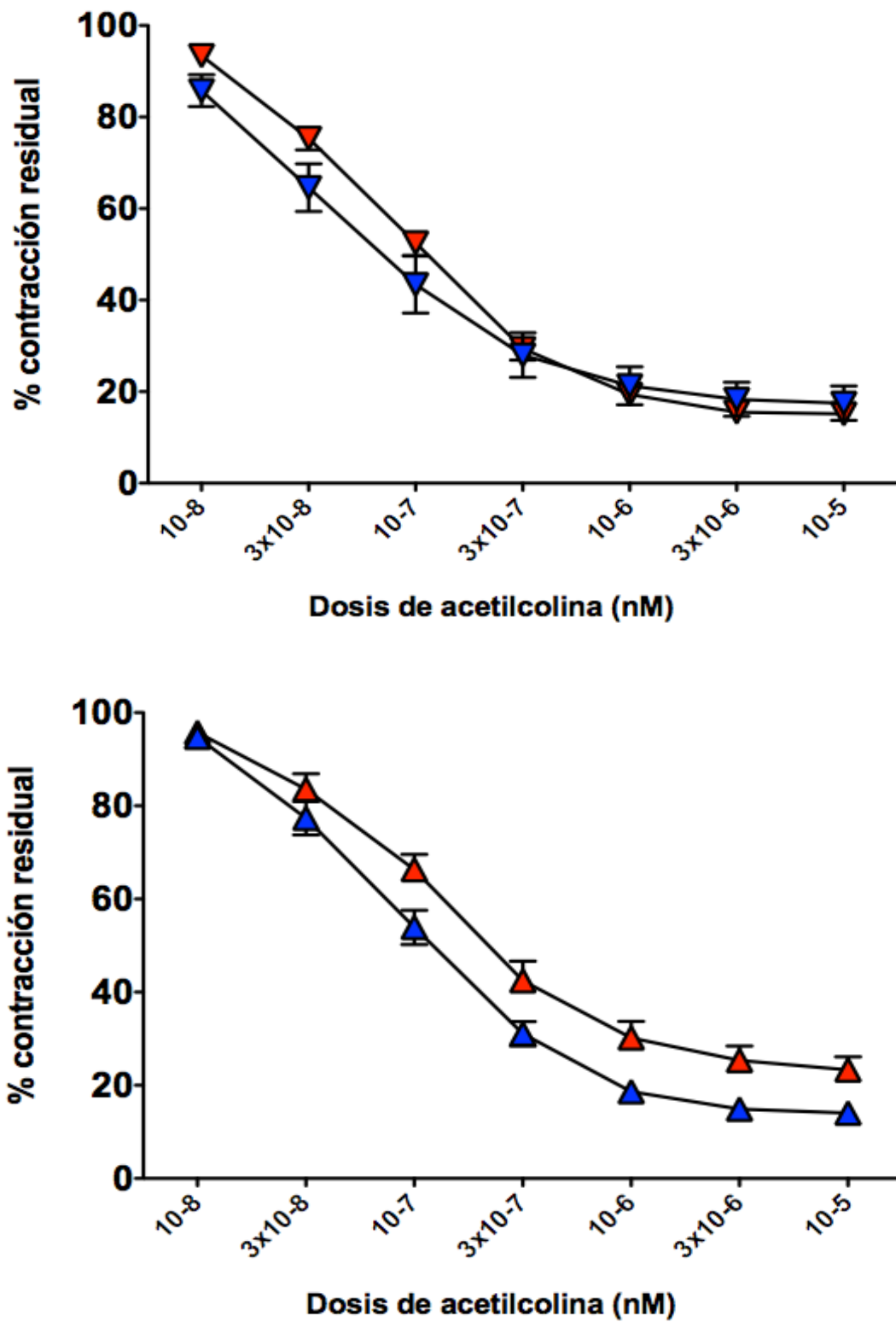


Figura 45. Respuesta vascular contráctil a diferentes dosis de acetilcolina de anillos normales de aorta de rata. Ver leyenda de la figura 44.

Discusión

1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 1: DISEÑO DE UN MODELO DE DAÑO PULMONAR AGUDO EN UN SISTEMA DE PULMÓN AISLADO VENTILADO *EX VIVO*

El daño pulmonar agudo (DPA), tal como se ha definido en la sección de la Introducción, es un síndrome de insuficiencia respiratoria aguda cuya causa es edema pulmonar debido a aumento de la permeabilidad alveolo-capilar e inflamación pulmonar aguda. Si cumple ciertos criterios clínicos (*vide supra*) se denomina SDRA.

Los primeros dos objetivos del presente estudio son demostrar que el modelo aquí descrito se asocia con: (i) edema pulmonar por hiperpermeabilidad (con el consiguiente deterioro de las propiedades mecánicas del pulmón), lesión celular pulmonar y cambios histológicos característicos; (ii) una respuesta inflamatoria mensurable en el tejido pulmonar. En efecto, como se discutirá a continuación, el insulto biomecánico (ventilación mecánica con V_T elevado) induce cambios consistentes comparables con el desarrollo de DPA.

El modelo de DPA diseñado en el presente trabajo muestra la respuesta de pulmones aislados a un daño de tipo mecánico (biotrauma). La señal mecánica es transducida a una señal bioquímica (mecano-transducción) que induce daño celular. Este daño es inducido en nuestro caso por el uso de un V_T elevado y PEEP = 0 cm H₂O.

Estudios experimentales muestran que las paredes alveolares en roedores sanos no sufren estiramiento hasta que los volúmenes exceden alrededor de un 40% de la capacidad pulmonar total (111). Por esta razón se justifica utilizar un V_T tan elevado en nuestro modelo (162). Tremblay *et al.* mostraron que la VM con V_T elevado causa una disrupción directa y necrosis del epitelio alveolar en ratas (121). Varios trabajos anteriores han utilizado regímenes ventilatorios similares para inducir daño pulmonar (74, 75, 94, 115, 123, 129, 156, 163-165).

Matute-Bello definió, de acuerdo con los resultados de una conferencia de consenso siguiendo la metodología Delphi, que un modelo animal de DPA debe reunir ciertos criterios, como son cambios histológicos indicativos de daño en el tejido pulmonar,

respuesta inflamatoria aguda con aumento de la permeabilidad microvascular y del epitelio alveolar, así como otros cambios fisiopatológicos característicos de la enfermedad (166).

En el presente modelo se reproducen, por tanto, las características propias del DPA y SDRA, como se discutirá posteriormente, resultando adecuado para el estudio del DPA y SDRA.

1.1. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP

Las alteraciones fisiopatológicas inducidas por la VM con V_T elevado encontradas (*vide infra*) se acompañan de cambios en la mecánica respiratoria como son el aumento de un 50% de la PIP en comparación con al grupo ventilado con V_T bajo. Este aumento se produce de forma progresiva desde el inicio del período de VM (Fig. 18). Nuestros resultados coinciden con los de otros trabajos que han analizado la PIP en el contexto de VILI tanto *ex vivo* (120, 156) como *in vivo* (166).

Descartando en nuestro trabajo que la presión arterial pulmonar no cambió a lo largo del tiempo en ninguno de los grupos, este cambio en la presión en la vía aérea asociado al uso de V_T elevado indica una alteración de las propiedades mecánicas del pulmón, probablemente debido a la formación de edema.

Múltiples estudios han analizado los mecanismos de la formación de edema en el VILI (115, 164, 165, 167), apoyando el concepto de que el aumento de la PIP asociado al uso de V_T elevado es debido a la formación de edema en el contexto de la inflamación inducida por el biotrauma (31, 74, 81, 91, 120, 134, 156, 168-171).

El peso del pulmón (relación peso húmedo / peso seco), indicador directo de la formación de edema, no fue medido en el presente estudio. Sin embargo, los cambios en la permeabilidad alveolocapilar (*vide infra*) sugieren fuertemente que el insulto (VM con V_T elevado) se asocia con formación de edema tisular (110, 120, 163, 165, 167, 172).

Por otro lado, puesto que no se midió la presión plateau en la vía aérea, no se puede descartar que el aumento observado en la PIP se pudiera explicar por cambios en la resistencia de la vía aérea más que por cambios en el parénquima pulmonar en el contexto del DPA (173, 174). No obstante, en consideración a la literatura previa sobre el

DPA y el VILI (120, 163, 165, 167), en la cual se demuestra que los cambios durante el VILI se producen en el parénquima pulmonar más que en la vía aérea, es más plausible que la elevación de la presión en la vía aérea se deba a cambios en el parénquima pulmonar en el contexto de inflamación inducida por la VM. Sin embargo, nuestros resultados no permiten excluir totalmente el aumento de la resistencia en la vía aérea como explicación del aumento de la PIP.

1.2. Estructura del pulmón: estudio histológico

Los cambios histológicos asociados al DPA en humanos incluyen formación de edema, infiltrado neutrofílico, engrosamiento de la membrana alveolocapilar, hemorragia intraalveolar y formación de membranas hialinas (166). Desde el punto de vista histológico, estos cambios son colectivamente denominados daño alveolar difuso (DAD) (ver Introducción).

Aunque los modelos animales de DPA/SDRA deben reflejar estas características, no todos los modelos reproducen todas ellas (146). En nuestro caso, la demostración de la formación de membranas hialinas confiere especial relevancia al modelo, pues este cambio histológico es considerado el cambio clínico característico del SDRA (8, 11, 17, 115, 169, 175, 176). Para determinar el grado de daño histológico se empleó un índice basado en los trabajos de Muscedere y Copland (18, 19) utilizado en trabajos previos de nuestro grupo (Ver Material y Métodos) (12, 74, 115, 148) y de otros grupos (169, 131, 177).

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos utilizando modelos de DPA en pulmones ventilados *ex vivo* en los que se ha descrito la presencia de membranas hialinas como uno de los cambios característicos de DPA, en combinación con hemorragia, acúmulo de macrófagos y edema intersticial (164).

Por tanto, la VM utilizando V_T elevado en nuestro modelo de pulmón ventilado *ex vivo* induce cambios histológicos característicos de DAD (como es, p. ej., la formación de membranas hialinas).

1.3. Permeabilidad alveolo-capilar: concentración de proteínas totales en el LBA y en el líquido de perfusión

La membrana alveolo-capilar está formada por un epitelio alveolar y un endotelio vascular. Debido al daño vascular y epitelial pulmonar inducido por la VM, la permeabilidad a las proteínas aumenta, con la consiguiente formación de edema pulmonar (no de origen hidrostático, sino por hiperpermeabilidad, cambio característico del DPA y del SDRA). Por ello, hemos cuantificado la permeabilidad alveolo-capilar mediante la medición de la concentración de proteínas en el LBA, de forma semejante a como anteceden otros modelos *ex vivo* (120, 163, 165, 167). El desarrollo de hiperpermeabilidad en nuestro modelo queda documentado, pues, por el hallazgo de un marcado aumento de la concentración de proteínas totales en el LBA (Fig. 10). En consonancia con nuestros resultados, de forma semejante, otros estudios previamente publicados han demostrado el desarrollo de hiperpermeabilidad inducida por el biotrauma (121, 163, 165, 172, 178, 179).

Algunos trabajos en modelos *in vivo* han sugerido que es necesario un daño pulmonar previo al insulto mecánico (e.g., instilación de ácido clorhídrico, administración de endotoxina, etc.) para que se desarrolle daño pulmonar (172). Sin embargo, otros trabajos, incluyendo estudios de nuestro laboratorio, han demostrado que la VM con V_T elevado puede inducir daño pulmonar en pulmones previamente sanos (70, 74, 94, 112, 115, 123, 148, 168, 172).

Es posible que el aumento de la concentración de proteína en el LBA no se deba a un aumento de la permeabilidad alveolocapilar sino a un aumento en el contenido celular en el espacio alveolar, en el contexto de la inflamación inducida por la VM.

En efecto, el DPA se asocia con cambios celulares en el espacio alveolar, como acúmulo de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y activación de macrófagos alveolares (180-183). Los neutrófilos contribuyen a la lesión pulmonar durante la respuesta inflamatoria y al aumento de permeabilidad alveolocapilar (180-183). Sin embargo, el papel necesario de los neutrófilos no está bien definido, como lo documenta la observación de casos de SDRA en pacientes neutropénicos (20, 23) y en modelos animales con DPA independiente de neutrófilos (184, 185).

Así pues, para descartar un origen del aumento de la concentración de proteína en el LBA diferente del aumento de la permeabilidad alveolocapilar, sería necesaria la medición de una molécula que proceda necesariamente del espacio intravascular como puede ser la albúmina o, en modelos *in vivo*, la IgM. Nosotros no realizamos estas mediciones. Sin embargo, se puede argumentar que es difícil explicar el marcado aumento de la concentración de proteína en el LBA simplemente por un aumento del número de células en el espacio alveolar y que la mejor explicación de este hallazgo es un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar.

El modelo en estudio reproduce, pues, una condición fisiopatológica caracterizada por el desarrollo de hiperpermeabilidad alveolocapilar, como lo demuestra el aumento de la concentración de proteínas en el espacio alveolar.

1.4. Daño celular: actividad de ALT, AST y LDH

Nuestro modelo se acompaña, así mismo, de cambios indicativos de lesión celular, como son el aumento de la actividad de ALT, AST y LDH en el LBA (espacio alveolar). Si se produce lisis celular o las membranas celulares están dañadas, las enzimas citoplasmáticas (ALT, AST y LDH) son liberados al espacio extracelular (186-189).

Estudios previos han demostrado que la actividad de LDH en el lavado broncoalveolar (LBA) es útil para determinar daño del tejido pulmonar y lesión celular endotelial pulmonar (190-194). En otros estudios con modelos en rata se ha demostrado que la lesión inducida sobre las células endoteliales produce liberación de estas enzimas al intersticio y, debido a una barrera epitelial alveolar comprometida, podrían acceder al espacio alveolar. Schultze *et al.* (194) sugieren que el aumento de la actividad de LDH en LBA procede del propio tejido pulmonar tras una lesión pulmonar inducida experimentalmente. El trabajo de Henderson *et al.* (186) también sugiere que el origen de la LDH en LBA es probablemente el daño infligido a las células pulmonares. Así pues, parece que el aumento de LDH en LBA en varios trastornos pulmonares asociados a inflamación y daño celular se origina en el intersticio pulmonar y fluye a través del epitelio alveolar más permeable, detectándose en el LBA (espacio alveolar), como posiblemente sucede en el presente estudio.

Este concepto también ha sido invocado con referencia a AST, cuyo aumento en el LBA se demostró tras una sobredistensión moderada (187). Sin embargo, otro estudio realizado por Lu *et al* (189) analizaron los cambios producidos en ALT, AST y LDH en el LBA tras el tratamiento con garlicina (suplemento dietético natural a base de ajo que presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y propiedades beneficiosas para el sistema circulatorio). En este estudio realizado en ratas con daño pulmonar producido por neumonía por *Pneumocystis carinii* se pretendía estudiar el efecto protector de la garlicina sobre el daño pulmonar infringido, aunque no encontraron diferencias significativas en los niveles de ALT, AST y LDH.

En resumen, la explicación plausible, por tanto, de este aumento de enzimas en el LBA es que el daño mecánico en el contexto de la VM con V_T elevado lesiona las células, liberando las enzimas desde el interior celular hacia el intersticio y, eventualmente, al espacio alveolar, proceso facilitado si existe además un aumento de la permeabilidad epitelial. Sin embargo, no podemos determinar cuál es el tipo celular que libera el contenido enzimático (células endoteliales, epiteliales alveolares o bronquiales, u otro tipo celular presente en el intersticio pulmonar).

También se encontró en nuestro estudio un aumento de la actividad de AST y LDH en el líquido de perfusión asociado a la administración de V_T elevado. Varios trabajos han analizado la presencia de LDH en el líquido de perfusión en estudios *ex vivo* como indicador de daño pulmonar (195-198). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha analizado la actividad de AST. La actividad de estas enzimas en el líquido de perfusión debe ser inexistente (dada la composición del líquido de perfusión). Por tanto, el hallazgo de un aumento de la actividad de AST y LDH en el líquido de perfusión asociado a la administración de V_T elevado, puede deberse a: (i) daño endotelial y liberación de enzimas desde el interior celular; o bien (ii) un aumento de la permeabilidad alveolocapilar y translocación de las moléculas desde el espacio alveolar y el intersticio pulmonar hacia el espacio intravascular.

El cálculo de la ratio de la actividad en el espacio alveolar y el espacio intravascular puede apoyar una u otra hipótesis. Un aumento de la ratio (mayor en el grupo V_T elevado que en el grupo V_T bajo) sugiere, aunque no demuestra, que el aumento observado en el líquido de perfusión puede ser secundario al aumento observado en el espacio alveolar.

Si la ratio disminuye, se pueden proponer dos explicaciones: (i) existe un aumento primario en el espacio intravascular (por lesión endotelial o incluso, como veremos en el cap. 3, originado en los elementos formes presentes en el líquido de perfusión), explicativo de los cambios observados en la actividad en el líquido de perfusión; (ii) la permeabilidad alveolocapilar aumenta, permitiendo paso de moléculas desde el intersticio y el espacio alveolar hacia el espacio intravascular. Ambas explicaciones son plausibles.

En nuestro caso, el aumento de la ratio de la actividad de ALT y (sin alcanzar la significación estadística) LDH son consistentes con un aumento en el líquido de perfusión, secundario al aumento en el espacio intersticial o alveolar. En el caso de la AST, cuya ratio se aproxima al valor de 1 en el grupo sometido a V_T elevado, podría argumentarse que el aumento de la actividad en el líquido de perfusión puede deberse bien a un aumento de la permeabilidad alveolocapilar y translocación desde el espacio intersticial o alveolar hacia el espacio intravascular (183) o bien a un aumento primario en el espacio intravascular debido a lesión endotelial. Esta segunda explicación es más probable puesto que el aumento observado en el líquido de perfusión (V_T bajo *versus* V_T elevado) es de aproximadamente 6 veces, mientras que el aumento observado en el espacio alveolar es de unas 3,8 veces. Otro mecanismo potencialmente explicativo del hallazgo es un paso del espacio intra-alveolar hacia el espacio intravascular más fácil para AST que para ALT y LDH. EL peso molecular del tetrámero de LDH (137.000 D) y de los dímeros de AST (90.000 D) y de ALT (110.000D) podría quizá remotamente apoyar esta explicación, ya que la enzima de menor peso molecular es la AST.

Igualmente se puede razonar que el aumento de la actividad de la LDH en el líquido de perfusión, acompañada de un aumento de la ratio de su actividad (actividad LBA/líquido de perfusión) en V_T elevado *versus* V_T bajo, puede deberse tanto a un aumento de la permeabilidad alveolocapilar y translocación desde el espacio alveolar o intersticial hacia el espacio intravascular, como a un aumento primario en el espacio intravascular debido a lesión endotelial. En este caso, puesto que la actividad LDH aumenta (V_T elevado *versus* V_T bajo) unas 4 veces en el LBA y unas 2 veces en el líquido de perfusión, ambas explicaciones son posibles.

En conclusión, nuestros resultados indican daño celular pulmonar asociado a la administración de VM con V_T elevado. El tipo celular que origina la liberación enzimática

puede ser epitelial bronquial o alveolar, o algún tipo celular presente en el intersticio. Los cambios en el líquido de perfusión pueden explicarse, bien por un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar y translocación de moléculas desde el espacio alveolar o intersticial hacia el espacio intravascular, o bien por un aumento primario en el espacio intravascular debido a daño endotelial.

1.5. Cambios en el equilibrio ácido-base

La aplicación de ventilación mecánica “protectora” (e.g., utilizando V_T bajo para disminuir el trauma mecánico debido a un estiramiento cíclico del tejido pulmonar) conduce frecuentemente a un aumento de la PaCO_2 (“hipercapnia permisiva”) tal y como ha sido demostrado en otros estudios *ex vivo*. Esta hipercapnia se asocia con múltiples cambios biológicos (164). La hipercapnia tiene efecto sobre la producción del surfactante (199, 200), la modulación de la permeabilidad vascular (201) y la regulación del NO (202).

En general, el concepto actual más aceptado respecto a la hipercapnia es que ejerce una protección sobre el daño pulmonar, atenuando la lesión de la barrera alveolo-capilar y disminuyendo así la formación de edema pulmonar (164).

En nuestro modelo *ex vivo*, el uso de un V_T elevado para inducir daño pulmonar se asociaría a hipocapnia. Sin embargo, en el presente contexto del modelo experimental (órgano aislado) y de las condiciones de oxigenación (administración de carbógeno en el baño del líquido de perfusión), no es de esperar que se encuentren cambios en el equilibrio ácido-base, en la PO_2 o en la PCO_2 .

Cabe recordar también que en el grupo de alto V_T se añadió un tramo más en la tubuladura para aumentar así el espacio muerto (dead space, VD) y evitar que la hipocapnia pudiera actuar como factor de confusión en el grupo de animales sometido a un V_T elevado. Variaciones en el pH podrían alterar la expresión de genes, la función de enzimas y otras funciones biológicas.

La ventilación del espacio muerto es el porcentaje de ventilación que no participa en el intercambio gaseoso. Tiene un componente anatómico definido por las vías aéreas de conducción y la vía aérea artificial, y un componente alveolar representado por los alvéolos que están ventilados pero no perfundidos, aumentando cuando hay una

reducción del flujo sanguíneo pulmonar. La aplicación de presión positiva a la vía aérea produce distensión de las vías aéreas de conducción, con lo cual el espacio muerto anatómico se incrementa. Por otra parte, la sobredistensión de los alveolos normales puede causar una compresión de los capilares alveolares, reducir la perfusión y ocasionar un aumento del espacio muerto alveolar (ventilación en exceso de perfusión) .

Parte del diseño experimental consistió en encontrar la cantidad de espacio muerto (tubuladura del respirador hacia el pulmón) que ha de ser aumentada para mantener constante la ventilación alveolar y, por tanto, la PCO_2 .

En efecto, la PCO_2 depende de la ventilación alveolar (VA) y de la producción de CO_2 (procedente del metabolismo celular de los órganos e inexistente en el presente modelo de órgano aislado):

$$PCO_2 = VCO_2 / VA$$

Por otro lado, la VA depende del volumen alveolar y de la frecuencia respiratoria (FR).

$$VA = \text{volumen alveolar} \times FR$$

El V_T tiene dos componentes: el volumen que participa en el intercambio gaseoso (volumen alveolar) y el que no participa en el intercambio gaseoso (VD):

$$V_T = \text{volumen alveolar} + VD$$

Por tanto,

$$\text{volumen alveolar} = V_T - VD$$

Al aumentar el V_T en el grupo sometido a VM con V_T elevado, aumenta el volumen alveolar y la VA, disminuyendo la PCO_2 .

Con el objeto de evitar que disminuya la PCO_2 al aumentar el V_T y, por tanto, el volumen alveolar y la VA, se aumenta el VD en el presente modelo para que el volumen alveolar (y, por tanto, la PCO_2) permanezca constante.

En experimentos de ensayo-error se llegó a conocer la cantidad de espacio muerto que era necesario añadiendo más longitud a la tubuladura del respirador hacia el pulmón, necesaria para que la PCO_2 permanezca constante durante el experimento.

La comparación de los valores de pH, pCO_2 , bicarbonato, exceso de bases y lactato indicó que no existían diferencias en ninguna de las variables en la situación basal entre

los dos grupos (V_T bajo y V_T elevado). Asimismo, tras el período de VM, ninguna de las variables cambió significativamente (Tabla 2).

En nuestros resultados, la ausencia de cambios en el equilibrio ácido-base en la PO_2 y PCO_2 es fundamental y de gran interés para la correcta interpretación de los cambios en otras variables estudiadas, particularmente en la expresión génica y mediciones que reflejan en general la respuesta inflamatoria que son sensibles a las condiciones ácido-base.

En efecto, el objetivo del diseño del presente modelo es definir unas condiciones en las que se pueda discernir los efectos del estiramiento (*stretch*) y del biotrauma (inducido por la VM con V_T elevado) de otros cambios asociados al uso de un V_T elevado (e.g., alcalosis en el contexto de la hipocapnia).

Aunque algunos estudios previos, utilizando modelos similares *ex vivo*, no contemplan las variaciones de pH y PCO_2 entre los grupos sometidos a V_T bajo y V_T elevado (120, 156, 165, 167), sí son datos tenidos en cuenta por parte de otros investigadores (163, 164). La investigación realizada por Kapetanakis *et al.*, justifica la importancia de la valoración de estas variables, pues en un modelo de VILI experimental *ex vivo* mostraron como la acidosis hipercápnica atenuaba el desarrollo de edema pulmonar inducido por el VILI siendo este fenómeno apoyado también por varios investigadores (163, 164).

En resumen, nuestros resultados indican, en el contexto del objetivo 1 planteado en la presente investigación, que el protocolo de ventilación *ex vivo* de pulmón perfundido con KS se asocia con cambios característicos de DPA, incluyendo empeoramiento de las condiciones mecánicas del pulmón, cambios histológicos consistentes con DAD, aumento de la permeabilidad alveolocapilar y daño celular.

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN DE PULMÓN AISLADO CON V_T ELEVADO SE ASOCIA CON UNA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL

Las alteraciones anteriormente discutidas en la mecánica, estructura, permeabilidad alveolo-capilar y daño celular pulmonar, suceden en el contexto de una respuesta inflamatoria.

Estudios previos han documentado el desarrollo de esta respuesta inflamatoria inducida por la VM utilizando V_T elevados, demostrando una elevación de mediadores inflamatorios en modelos de VILI en rata tanto *ex vivo* como *in vivo* (70, 74, 88, 94, 115, 118-120, 123, 125, 156, 165, 203, 204) .

El modelo *ex vivo* de pulmón de rata del presente estudio es claramente diferente de la situación *in vivo* en algunos aspectos: los pulmones sufren isquemia y, debido a la inexistencia de la pared torácica, hay una mayor sobredistensión pulmonar al final de la inspiración para cada valor de PIP, acompañada de colapso alveolar completo al final de la espiración en condiciones de PEEP = 0 (grupo V_T elevado). Este factor actúa aumentando el daño pulmonar por la apertura y cierre cíclico de unidades alveolares que permanecen cerradas durante la inspiración y se abren al aplicar presión positiva en la vía aérea durante la espiración (atelectotrauma).

Este modelo *ex vivo* de pulmón se ha utilizado para investigar de forma exitosa la lesión pulmonar bajo diversas estrategias de ventilación por parte de otros investigadores (18, 121).

A la luz de la complejidad y la redundancia de la red de citoquinas, se ha de tener cautela en la interpretación de los cambios de la concentración de las citoquinas individuales (205-207). En el presente estudio hemos analizado algunas citoquinas que tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria (IL-6, MCP1, IL-1 β , TNF α), quimiotaxis

(MIP-2) y respuesta anti-inflamatoria (IL-10), seleccionadas de acuerdo con publicaciones previas sobre la patogénesis del DPA (88, 89, 208).

Los resultados obtenidos en este modelo *ex vivo* de DPA inducido por la VM son consistentes con los hallazgos de otros modelos aislados de pulmón, cultivo de células y modelos animales *in vivo*, así como las observaciones hechas en estudios en pacientes (89, 156, 209-213). Estas citoquinas pueden ser un marcador de lesión pulmonar. Adicionalmente, su presencia puede también jugar un papel en la patogénesis del DPA inducido por la VM (52, 63, 178, 208, 214).

2.1. Inflamación pulmonar

En la presente investigación se ha evaluado la respuesta inflamatoria pulmonar desde dos perspectivas complementarias: mediante la cuantificación de la concentración de citoquinas en tejido pulmonar (95, 216-218) y mediante la medición de la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria (215, 217, 219).

2.2. Concentración de citoquinas

Las citoquinas activan vías de señalización por la activación de receptores específicos implicados en la activación de señales que conducen a la expresión de genes. Sin embargo, el fin del presente estudio únicamente nos permite concluir sobre una parte de la señalización de la respuesta inmune.

La concentración tisular de IL-6 y (sin alcanzar la significación estadística) IL-10 aumentó en el presente modelo, mientras que la concentración de MCP-1 y MIP-2 tendieron a disminuir (sin alcanzar la significación estadística) e IL-1 β se mantuvo estable. Los cambios encontrados indican, pues, una respuesta inflamatoria inducida por la VM con V_T elevado *ex vivo* que implica cambios tanto en citoquinas pro- como anti-inflamatorias. El papel de la IL-6 es dual. Sin embargo, los cambios encontrados en otras citoquinas (disminución de MCP-1, MIP-2 y elevación de IL-10) sugieren un perfil predominantemente anti-inflamatorio. Es destacable la ausencia de cambios en la concentración de IL-1 β , citoquina cuya concentración se encuentra generalmente alterada en modelos de ALI y de VILI. Este hallazgo pone de manifiesto las peculiaridades de cada

modelo y la necesidad de caracterizar los cambios en cada modelo específico antes de planear su uso y diseñar estudios específicos.

IL-10 se ha implicado como un regulador importante de las funciones de células linfoides y mieloides. La capacidad de IL-10 para bloquear la activación de la síntesis de citoquinas y varias funciones de los macrófagos hace de esta citoquina un potente supresor de las funciones efectoras de los macrófagos, células T y células NK, tal y como ha sido defendido por diversos autores (89, 210, 211). Hofstetter *et al.*, mostraron que la IL-10 nebulizada en los pulmones en concentraciones terapéuticas eficaces provoca efectos anti-inflamatorios en las células inmunocompetentes que son comparables a los ya conocidos a partir de su administración intravenosa en endotoxemia experimental (210). Lee *et al.*, sugieren que la IL-10 juega un papel importante en la protección de células epiteliales fetales de tipo II tras someterlas a VM (211). Hoegl *et al.*, muestra como la inhalación profiláctica de IL-10 mejora la supervivencia y la lesión pulmonar se ve reducida en un modelo de VILI experimental (89). Los resultados indican que este efecto puede estar mediado por la inhibición de la inflamación inducida por el estrés y biotrauma pulmonares. Este efecto de la IL-10 ha podido provocar en el presente trabajo, junto al aumento de IL-6, la disminución del resto de citoquinas. Todos estos datos se ven apoyados en los hallazgos de otros investigadores (89, 210, 211).

En modelos animales, varios estudios previos han probado el desarrollo de una respuesta inflamatoria inducida por la VM utilizando V_T elevados, demostrando el papel de diferentes mediadores inflamatorios (TNF α , IL-6, MIP-2, IL-10 entre otros) en modelos de VILI en rata, tanto *ex vivo* como *in vivo* (88, 94, 119, 120).

Tremblay *et al.*, en un modelo de pulmón aislado no perfundido de rata en presencia o ausencia de un estímulo inflamatorio preexistente (LPS) y tras ser sometidos a distintas estrategias lesivas de ventilación durante dos horas describieron la elevación de TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6 y MIP-2 en el LBA, apoyando el papel de las citoquinas tanto para iniciar como para propagar localmente y de forma sistémica la respuesta inflamatoria (120). Chiumello *et al.* en un modelo *in vivo* de VILI inducido en ratas mediante aspiración de ácido seguida de cuatro horas de VM, encuentran a partir de dos horas de VM elevación de los niveles de MIP-2 y TNF α en el LBA (94). Haitsma *et al.*, midieron estos productos en suero y en LBA en un modelo *in vivo* de VILI en ratas (122). Encontraron que incluso

en los animales ventilados con parámetros normales se elevaban ligeramente IL-6 y MIP-2. Los cambios en la concentración de citoquinas eran más marcados cuanto más lesiva fuera la estrategia de ventilación empleada. La respuesta inflamatoria es dependiente del tiempo, pues fue más marcada al minuto 240 que al minuto 90 de VM, igual que han documentado otros investigadores (203). Ricard *et al* encontraron en pulmones de ratones ventilados *ex vivo* no perfundidos durante 2 h y tratados con LPS elevación de la IL-1 en el grupo ventilado con $V_T = 42$ ml/kg *versus* $V_T = 7$ ml/kg, mientras que la concentración de TNF α no difirió en los dos grupos (220). Varios investigadores analizaron en un modelo VILI la presencia de TNF- α , IL-1- β , IL-6 e IL-10 en tejido pulmonar tal y como se realiza en el presente modelo, obteniendo resultados similares (70, 132, 144, 221-223).

Por tanto, los diferentes modelos de DPA inducido por la VM encuentran en general un aumento de citoquinas consistente con una respuesta pro-inflamatoria que es tiempo dependiente. Sin embargo, nosotros encontramos, tras 2.5 h de VM con V_T elevado, cambios en la concentración de citoquinas cuyo patrón indica quizá más un perfil anti- que pro-inflamatorio. Esta aparente discrepancia podría explicarse en el contexto de las siguientes consideraciones.

Primero, el desarrollo de la respuesta inflamatoria es tiempo dependiente, como se ha demostrado en la variabilidad de estas citoquinas en otros estudios. Es posible que el perfil definido por los cambios en la concentración de las diferentes citoquinas analizadas fuera diferente en otros puntos en el tiempo durante la aplicación de la estrategia ventilatoria correspondiente.

Segundo, ninguno de los estudios citados más arriba ha utilizado un modelo de ventilación de pulmón aislado *ex vivo* y perfundido por KS. Es posible que la perfusión con solución de Krebs determine cambios en la concentración de citoquinas en el tejido pulmonar o en el espacio alveolar diferentes que en condiciones de no perfusión. Asimismo, ha de considerarse que las mediciones en estudios previos *ex vivo* se realizan con frecuencia en el LBA (74, 89, 124, 153, 156, 172) y en menor medida en suero (e.g., líquido de perfusión) (74, 89, 124, 153) pero no en tejido pulmonar.

Tercero, como se verá más abajo, nosotros encontramos cambios en la expresión génica indicativos de una respuesta pro-inflamatoria. Los cambios en la expresión génica se

relacionan de forma compleja con los cambios en la concentración de las proteínas correspondientes y con frecuencia son cambios no coincidentes. Esta falta de coincidencia puede deberse a feed back negativo en la expresión génica en condiciones en que la concentración de la proteína aumenta, a feed back positivo sobre la expresión génica si la concentración de la proteína disminuye, o al tiempo necesario para que la transcripción del RNA mensajero sufra el proceso de traducción.

Cuarto, nuestro modelo se caracteriza por otros cambios que indican el desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria, como son los que sugieren formación de edema (e.g., deterioro de la mecánica pulmonar, apariencia visual de los pulmones al final del período de VM, cambios histológicos consistentes con DAD).

Estudios en humanos también han documentado el papel de las citoquinas estudiadas en la patogénesis del DPA y, de forma más específica, del daño pulmonar inducido por la VM. Por ejemplo, se ha descrito una elevación de la concentración de IL-6 en el LBA de pacientes con riesgo de SDRA (224-226). Se debate sobre cuál es la función exacta de la IL-6, puesto que es conocido que su papel puede ser tanto pro- como anti-inflamatorio en modelos de VILI en ratones, dependiendo del modelo utilizado (212, 226-231).

Donnelly *et al.* (232) encontraron que pacientes con SDRA que fallecieron presentaban una concentración baja de IL-10 en el LBA durante el inicio del síndrome, sugiriéndose una inadecuada contra-regulación de la respuesta inflamatoria pulmonar. Estos resultados subrayan la importancia del desequilibrio pro-inflamatorio / anti-inflamatorio en el SDRA. Este concepto ha sido elaborado por Halbertsma *et al* (88), quien propuso que el equilibrio entre citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8) y citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) es determinante del tipo de respuesta inmune encontrada.

Estas publicaciones muestran que la respuesta inflamatoria pulmonar producida por la VM, tanto *ex vivo* como *in vivo*, resulta muy heterogénea, reflejando la complejidad de la cascada de citoquinas.

Nuestros resultados encuentran, pues, cambios en la respuesta inflamatoria. Aun cuando la concentración de proteínas en el tejido pulmonar indica quizá un perfil anti-inflamatorio, otros cambios encontrados en la presente investigación, como son el aumento de la permeabilidad alveolocapilar y otros cambios sugerentes de formación de edema pulmonar (como son el aumento de la concentración de proteínas en el LBA y la

aparición visual de los pulmones al final del periodo de VM), así como los cambios detectados en la expresión génica (*vide infra*), indican claramente una respuesta pro-inflamatoria.

Aun cuando el presente diseño no permite explicar las posibles causas de las discrepancias observadas entre nuestros resultados y los descritos en otros estudios, nuestros resultados sugieren que el perfil de la respuesta inflamatoria puede ser diferente si las mediciones se realizan en tejido pulmonar o en fluido de LBA, o en modelos de ventilación *ex vivo* perfundidos o no perfundidos.

2.3. Expresión génica

Los estudios sobre expresión génica en la presente investigación documentan asimismo profundos cambios en la respuesta inflamatoria. Nuestro estudio sigue la misma línea que las investigaciones previas respecto a la expresión de genes (99, 119, 120, 213, 217, 219, 233), observándose un aumento de expresión génica tras someter a los pulmones a V_T elevado. La expresión de los genes de MCP-1 y MIP-2 (equivalente murino a IL-8 humana) y (sin alcanzar la significación estadística) IL-6, IL-10 y TNF- α presentó un aumento en el grupo sometido a V_T elevado en comparación con el grupo sometido a V_T bajo (Fig. 16). Estos cambios indican una respuesta inflamatoria compleja que afecta tanto a genes implicados en la respuesta pro- como anti-inflamatoria.

Encontramos concordancia entre la concentración de citoquinas y la expresión génica para la IL-6, y IL-10.

Sin embargo, la concentración tisular de MCP-1 y MIP-2 disminuyó, mientras que la expresión génica correspondiente mostró un aumento significativo (Fig. 15). No es esperable que exista una perfecta concordancia entre los cambios en la concentración de citoquinas y los cambios en la expresión génica correspondiente, como se ha discutido más arriba. Por otro lado, el presente diseño no permite explicar las causas concretas de los cambios de la expresión génica y de la concentración de citoquinas, o de la discordancia entre la concentración de proteína y la expresión génica correspondiente en algunos casos.

En resumen, nuestro modelo se asocia con una respuesta inflamatoria que se puede documentar tanto mediante la medición de citoquinas en el tejido pulmonar como mediante la determinación de la expresión génica de genes implicados en la respuesta inflamatoria. Es importante reconocer que los resultados son posiblemente dependientes de la muestra (tejido *versus* fluido de LBA) del tipo de modelo *ex vivo* utilizado (perfundido *versus* no perfundido) y del punto en el tiempo en que se realizan las determinaciones. La demostración de estos cambios es fundamental para documentar la validez del modelo puesto que una característica esencial del daño pulmonar agudo es el desarrollo de una respuesta inflamatoria tisular.

2.4. Estrés nitro-oxidativo

La activación de la respuesta inflamatoria se acompaña de un aumento del estrés nitro-oxidativo. El aumento de la producción de ROS y RNS caracteriza al aumento del estrés oxidativo.

Los radicales libres causan numerosos efectos negativos sobre procesos celulares y moleculares. Los procesos oxidantes pueden producir daño y muerte celular modificando o alterando la estructura (e.g., membranas celulares) y función (e.g., sistemas energéticos celulares), conduciendo a la muerte celular.

Muchas alteraciones tanto agudas como crónicas se caracterizan por una acumulación de células inflamatorias activadas en la vía aérea distal y en los alveolos. Los fagocitos activados producen radicales de oxígeno altamente tóxicos que, junto al aumento de fagocitos locales, amplifica la carga oxidante sobre el tejido pulmonar. Numerosas líneas de investigación apoyan el hecho de que los radicales libres de oxígeno en el pulmón juegan un papel muy importante en la patogénesis del daño pulmonar (100, 215, 234-238).

La inducción de enzimas antioxidantes citoprotectoras locales en respuesta a insultos estresantes es capital para la detoxificación celular de ROS y RNS, y para el mantenimiento de la homeostasis y equilibrio redox celular. Estudios recientes han demostrado que el estiramiento cíclico asociado a la VM utilizando V_T elevado genera

ROS y desequilibrio redox en el epitelio pulmonar así como en las células endoteliales *in vitro* (215, 239, 240). Nuevas pruebas experimentales en modelos animales sugieren que el estrés oxidativo tiene un papel en el desarrollo y agravamiento de diversos síndromes clínicos como DPA, SDRA, sepsis, shock, y la cirugía mayor (235, 241). Otros estudios muestran una disminución de la actividad antioxidante y un aumento de los marcadores de estrés oxidativo plasmáticos en los pulmones sometidos a VM *in vivo* en consonancia con los estudios *in vitro* (236, 241).

Basado en estas observaciones, nuestro grupo planteó previamente la hipótesis de que la VM con V_T elevado se acompaña de un aumento del estrés oxidativo y de la formación de peroxinitrito y que el peroxinitrito tiene un papel en el daño celular y pulmonar asociado a la VM, como se ha sugerido previamente (155). De acuerdo con esta hipótesis, hemos demostrado en estudios previos en nuestro modelo *in vivo* nitración de proteínas en tejido pulmonar de ratas sometidas a VM con V_T elevado (242). Asimismo, en un reciente estudio hemos demostrado que la administración *in vivo* de MnTMPyP (un catalista de la descomposición de peroxinitrito, la principal especie nitrante en condiciones de inflamación), y 3-AB (un inhibidor de la enzima PARP, enzima activada por el peroxinitrito), se asocia con una atenuación del daño y disfunción pulmonares asociado a la VM con V_T elevado (243).

Adicionalmente, hemos demostrado disfunción vascular *in vitro* en anillos de aorta procedentes de animales sometidos a daño pulmonar inducido por la VM (102), como se discutirá más abajo. Nuestros resultados previos (102), indicando una mejoría de la función vascular tras el tratamiento *in vitro* con MnTMPyP y con tempol, apoyan el concepto de que la formación de radicales libres y de peroxinitrito tiene un papel en la disfunción de órganos (vascular en este caso) asociada al daño pulmonar inducido por la VM.

Los hallazgos de un aumento del estrés nitro-oxidativo en animales sometidos a daño pulmonar inducido por la VM están en consonancia con estudios previos en otros modelos semejantes *in vivo* (100, 155, 215, 239). Chapman *et al.* (239) mostró que el estiramiento de células epiteliales del pulmón en el VILI produce un aumento de la producción de ROS. Vaschetto *et al.* (155) sugirieron en un modelo de VILI en rata que la inhibición farmacológica de la activación de la PARP por el peroxinitrito atenuaba el daño pulmonar.

Papaiahgari *et al.* (215) demostraron que la modulación del estrés oxidativo inducido por VM confiere protección sobre el daño celular. Syrkina *et al.* (100) demostraron que el tratamiento con N-acetil cisteína (agente antioxidante) disminuye, no sólo el estrés oxidativo, sino también la producción de citoquinas y el consecuente influjo de neutrófilos producido por la VM lesiva. Quinlan *et al.* (39) mostró que pacientes no supervivientes de SDRA presentan mayores niveles de estrés oxidativo que los supervivientes.

Así, pues, en nuestro modelo *in vivo* de daño pulmonar hemos demostrado aumento del estrés nitro-oxidativo. En el presente estudio anticipamos en este contexto que la respuesta inflamatoria asociada a VM con V_T elevado se acompaña de un aumento del estrés nitro-oxidativo, tal como se ha documentado *in vivo* por nuestro equipo en modelos animales y en pacientes (100, 102, 237, 238, 244-247).

Sin embargo, en contra de la hipótesis inicialmente planteada, no hemos encontrado un aumento significativo de la inmunofluorescencia a 3-N-tyr ni de la fluorescencia a DHE (un marcador de la producción de radicales libres en general) en pulmones ventilados con V_T elevado.

En efecto, en el contexto de la marcada respuesta inflamatoria demostrada en nuestro modelo, acompañada de cambios en la permeabilidad alveolocapilar y en la estructura y función pulmonares, es esperable que existan también otros cambios asociados a la respuesta inflamatoria y a la formación de edema, como es el aumento del estrés nitro-oxidativo. Varias explicaciones pueden ser propuestas para justificar este hallazgo negativo.

Primero, es posible que el desarrollo de cambios indicativos de estrés nitro-oxidativo y detectables mediante técnicas de fluorescencia (utilizadas en el presente estudio) requiera una mayor duración del período de VM que el utilizado en el presente estudio tal y como sugieren otros estudios (248). En un modelo de VILI, Chacon-Cabrera *et al.*, en un estudio llevado a cabo en nuestro grupo (248), se muestra que el estrés oxidativo no se produce en órganos distantes o en los músculos esqueléticos de los roedores hasta después de varias horas de VM con volúmenes tidal de moderados a altos, aunque los niveles de oxidación de proteínas se incrementan en los pulmones de los animales con un menor tiempo de ventilación.

Segundo, es posible que en el modelo *in vivo* la concurrencia de otros muchos tipos celulares y tejidos contribuya a un mayor daño que en el caso del pulmón ventilado *ex vivo*.

Tercero, es posible que específicamente la concurrencia de elementos sanguíneos, ausentes en el modelo de ventilación *ex vivo* y perfusión con solución de Krebs, sea necesaria para el desarrollo de estrés nitro-oxidativo. Esta última explicación constituye de hecho una de las hipótesis del presente estudio, que fue probada y cuyos resultados serán discutidos a continuación.

Finalmente, hay que considerar que el perfil de los cambios en la concentración de citoquinas aquí descrito puede ser considerado como anti-inflamatorio, aunque una más adecuada definición de este perfil requeriría otras mediciones que las contempladas en la presente investigación. En este contexto, la ausencia de aumento del estrés nitro-oxidativo podría ser considerada como una manifestación de este perfil anti-inflamatorio.

3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3: DEMOSTRAR QUE LA COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN MODIFICA LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA VENTILACIÓN CON V_T ELEVADO

El modelo de ventilación *ex vivo* de pulmones perfundidos con solución de Krebs (KS) descrito en los objetivos 1 y 2 de la presente memoria, se asocia con cambios en la función y en la respuesta inflamatoria del pulmón. El modelo es, pues, adecuado para el estudio del daño pulmonar asociado a la VM y de la patogénesis del daño pulmonar agudo en general.

Sin embargo, cabe preguntarse si algunos de los cambios descritos y, específicamente, la ausencia de resultados positivos esperados (como es el caso, por ejemplo, de la ausencia de cambios en el estrés nitro-oxidativo), pueden estar modulados por la composición del líquido de perfusión.

El pulmón se encuentra perfundido por sangre en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en el presente modelo la composición del líquido de perfusión es asanguínea y contiene exclusivamente los componentes de la solución de Krebs. Esta característica del modelo es una peculiaridad que ha de considerarse para una correcta interpretación de los resultados.

La perfusión con un líquido artificial permite el estudio de los cambios en el pulmón debidos exclusivamente a la contribución de los elementos celulares presentes en el órgano, en ausencia de la influencia de otros tejidos y de la sangre. Sin embargo, puede ser deseable utilizar en el modelo de ventilación pulmonar *ex vivo* condiciones de perfusión fisiológicas, es decir, con sangre autóloga como parte de la composición del líquido de perfusión.

Como se ha descrito en detalle en la sección de Métodos, la adición de elementos sanguíneos al líquido de perfusión supone un aumento notable de la complejidad del modelo, que requiere una mayor dependencia del adiestramiento manual del operador y

un protocolo específico. Sin embargo, la perfusión con elementos sanguíneos puede tener interés, bien para aproximarse a condiciones fisiológicas en el modelo experimental, o bien para estudiar específicamente los efectos de la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión. En la presente investigación planteamos estudiar qué diferencias se pueden documentar en el modelo de ventilación *ex vivo* en presencia *versus* ausencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión.

Aunque previamente se ha comprobado en otros estudios que la presencia de la línea roja celular en el KS perfundido mejoró la integridad funcional y estructural del pulmón (249-251), apenas existen antecedentes sobre los efectos de la presencia de sangre en el líquido de perfusión en el modelo de ventilación pulmonar *ex vivo*. Kraft *et al.* (249) demostraron, en pulmones perfundidos de conejo, que la adición de sangre resultó en una hipertensión pulmonar durante la última hora de la perfusión pero no edema pulmonar o aumento de la permeabilidad macromolecular, apoyando nuestra hipótesis de que el edema observado se desarrolla en el contexto de inflamación inducida por la ventilación mecánica y no se debe a la perfusión de KS.

Para demostrar el efecto de la presencia de elementos sanguíneos en la composición del líquido de perfusión, se compararon los cambios en las variables de estudio observados en pulmones perfundidos con solución de Krebs sin elementos sanguíneos (KS) con los cambios observados en pulmones perfundidos con solución de Krebs a la que se adicionaron elementos sanguíneos (KS+S) (sangre autóloga, ver Métodos).

3.1. Consideraciones generales sobre la composición del líquido de perfusión

La composición del líquido de perfusión es un aspecto metodológico de gran importancia para mantener estable la preparación perfundida. Una alteración en la composición del líquido de perfusión puede modificar la respuesta inflamatoria y la formación de edema en los pulmones perfundidos.

El líquido de perfusión debe presentar una presión osmótica y oncótica similares a la sangre normal. Por otro lado, el líquido de perfusión debe proporcionar una fuente de energía y contener una composición electrolítica semejante a la del fluido extracelular

(252). En nuestro modelo seguimos estas normas de forma que los procesos celulares normales fueron preservados (253).

Los efectos de la composición del líquido de perfusión en cuanto a la concentración de coloides han sido analizados en numerosos estudios y, de forma particular, el papel de la albúmina. Chang *et al* (254) demostraron que 5 g/dl de albúmina en el líquido de perfusión proporcionaba protección contra la formación de edema. La adición de albúmina en el líquido de perfusión parece asociarse con más beneficios que los debidos simplemente al mantenimiento de un medio oncótico-osmótico adecuado (255) ya que también se han mostrado efectos positivos sobre el transporte de nutrientes y la eliminación de toxinas de las células durante la perfusión (256). En nuestro trabajo incorporamos con esta intención una solución Krebs-Henseleit (KS) enriquecida con un 4% de albúmina sérica bovina, composición utilizada en los protocolos correspondientes a los objetivos 1 y 2 (*vide supra*).

Otras modificaciones en nuestro modelo respecto a la composición de líquido de perfusión que lo aproximan más al contexto clínico que a continuación detallamos son la adición de carbógeno (20% O₂, 75% N₂, 5% CO₂), la incorporación de doble base, la adición de sangre autóloga y el mantenimiento de la temperatura a 37°C.

Numerosos artículos han definido el comportamiento metabólico de los pulmones, tanto sanos como dañados, en el contexto de la perfusión *ex vivo* (257-259). Un descubrimiento llamativo fue que los pulmones producen cantidades considerables de lactato (252, 260). De hecho, el 40%-60% de la glucosa utilizada por el pulmón se metaboliza a lactato. Sin embargo, un aumento excesivo de la concentración de lactato en el líquido de perfusión podría inhibir potencialmente la glicólisis, una vía metabólica fundamental a la hora de preservar la viabilidad del pulmón (261). Aunque el efecto *Pasteur* (aumento del metabolismo de carbohidratos bajo hipoxia) se ha descrito en los pulmones, se requeriría una hipoxia muy severa para que supusiese un cambio significativo (262, 263). En nuestro modelo prevenimos este proceso mediante la adición de carbógeno (20% O₂, 75% N₂, 5% CO₂), incorporando O₂ al líquido de perfusión al mismo tiempo que el burbujeo evita la precipitación de Ca²⁺ y la formación, por tanto, de carbonato cálcico con el circuito atemperado a 37°C. También incorporamos en nuestro líquido de perfusión

doble base para evitar variaciones apreciables del pH durante el experimento potencialmente producidas por el lactato, carbonato cálcico y albúmina.

3.2. Papel de los elementos sanguíneos en el líquido de perfusión

La utilización de líquido de perfusión con elementos sanguíneos en el presente modelo obedece a diferentes criterios. En primer lugar, el papel conocido de las células blancas en la respuesta pulmonar inflamatoria al VILI. En efecto, las citoquinas son producidas por las células epiteliales de bronquios, bronquiolos y alveolos, pero también por macrófagos y neutrófilos alveolares. Estudios experimentales en animales con depleción de neutrófilos demostraron una importante reducción en la gravedad del VILI (169).

En segundo lugar, el hallazgo en experimentos piloto en nuestro laboratorio de una respuesta inflamatoria diferente en pulmones ventilados *ex vivo* con líquido de perfusión sin elementos sanguíneos o con elementos sanguíneos (*vide infra*) (264, 265).

Por ello, en nuestro estudio hemos valorado el efecto de la composición del líquido de perfusión (con y sin sangre autóloga). Hemos analizado, pues, el efecto de la VM en dos condiciones: con perfusión con KS y con perfusión con KS al que se adiciona sangre autóloga (KS+S). Aunque hubo un similar deterioro de la mecánica respiratoria (PIP) y un similar aumento del *score* de daño pulmonar en pulmones ventilados con volúmenes altos en los grupos KS y KS+S, se han observado numerosas diferencias en determinados aspectos (en comparación con lo obtenido en el grupo KS).

Concretamente, los pulmones perfundidos con KS+S, en comparación con los perfundidos con KS, presentaron al recibir VM con V_T elevado:

1. mayor aumento de la actividad de LDH en el LBA;
2. mayor aumento de la actividad de ALT, AST y LDH en el líquido de perfusión;
3. menor concentración de IL-6 y MCP-1 y mayor concentración de IL-10 en tejido pulmonar;
4. menor expresión génica de MCP-1 y MIP-2;
5. aumento del estrés nitro-oxidativo.

En resumen, la presencia de elementos sanguíneos se asocia con diferentes cambios en la respuesta inflamatoria y en el grado de estrés nitro-oxidativo al administrar VM con V_T elevado. La descripción de este diferente fenotipo dependiente de la composición del líquido de perfusión ha de ser considerado en el diseño de estudios sobre la patogénesis del daño pulmonar.

En términos generales, como será detallado a continuación, la ausencia de literatura sobre el efecto de la composición del líquido de perfusión (específicamente de la presencia de elementos sanguíneos) en los cambios inducidos por la VM en pulmones ventilados *ex vivo*, hace que gran parte de la discusión de nuestros resultados esté basada en los efectos putativos, basados en otros modelos y en el conocimiento fisiológico de la presencia de elementos sanguíneos sobre la respuesta inflamatoria.

3.3. Mecánica respiratoria: cambios en la PIP y estudio histológico

Las alteraciones fisiopatológicas encontradas (*vide infra*) al administrar VM con V_T elevado se acompañan de cambios en la mecánica respiratoria, como son el aumento de aproximadamente un 50% de la PIP, en comparación con el grupo ventilado con V_T bajo. Este aumento se produce de forma progresiva desde el inicio del período de VM (Fig. 18).

Por otro lado, los pulmones ventilados con V_T elevado presentaron daño pulmonar histológico.

Como se ha discutido más arriba, los pulmones perfundidos con KS+S y con V_T elevado presentaron a lo largo del tiempo una elevación de la PIP, mientras que los ventilados con V_T bajo no presentaron cambios en la PIP durante el período de observación de 2,5h. La elevación de la PIP en los pulmones ventilados con V_T elevado fue similar en el grupo KS y en el grupo KS+S (Fig. 19). Estos resultados indican que la composición del líquido de perfusión no afecta al deterioro en la mecánica pulmonar inducido por la VM utilizando V_T elevado.

Debido a que apenas existen antecedentes sobre los efectos de la presencia de sangre en el líquido de perfusión en el modelo de ventilación pulmonar *ex vivo* con volúmenes

tidales elevados, no existen otros estudios en la literatura que hayan analizado el efecto sobre el cambio de la PIP o los cambios histológicos.

La consistencia de este hallazgo en el contexto de otros cambios asociados a la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (*vide infra*) ha de ser discutida. Como se menciona posteriormente, la perfusión con KS+S se asoció con una diferente respuesta inflamatoria al aplicar VM con V_T elevado, en comparación con el grupo perfundido con KS. Sin embargo, estos cambios en la respuesta inflamatoria no se acompañaron de una diferente mecánica pulmonar o histología al aplicar VM con V_T elevado en el grupo KS+S en comparación con el grupo KS. Por otro lado, hemos discutido: (i) que el deterioro de la mecánica pulmonar y los cambios histológicos se deben, de acuerdo con nuestra interpretación de los presentes resultados, a un aumento de la formación de edema en el contexto del biotrauma inducido por la VM con V_T elevado; (ii) la formación de edema se explica en el contexto de la respuesta inflamatoria. Se planea, pues, la cuestión de cómo se explica una menor respuesta inflamatoria (como se discute más abajo) en ausencia de cambios en otras variables sensibles a la formación de edema (cambios en la PIP) y en la histología (que refleja la respuesta inflamatoria).

Es posible que los cambios en la respuesta inflamatoria a la VM con V_T elevado en el grupo KS+S *versus* el grupo KS no sean de suficiente magnitud como para alterar los cambios en la mecánica y la histología pulmonares al aplicar VM con V_T elevado. En efecto, el deterioro de la mecánica pulmonar (aumento de la presión en la vía aérea) se debe, según sostenemos, al aumento de la formación de edema, el cual ha de estar en relación con la respuesta inflamatoria. Sin embargo, es fisiológicamente plausible argumentar que los cambios en la respuesta inflamatoria han de alcanzar cierta magnitud para modificar las variables utilizadas sensibles a la formación de edema (presión en la vía aérea) y los cambios histológicos (identificados en la presente investigación mediante microscopía óptica).

Por tanto, nuestra interpretación de la ausencia de efecto de la perfusión con KS+S (en comparación con KS) en los cambios en la mecánica pulmonar y en la histología inducidos por la VM con V_T elevado es que la modulación de la respuesta inflamatoria por la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión no alcanzó la magnitud suficiente como para cambiar la formación de edema durante la VM con V_T elevado.

3.4. Permeabilidad alveolo-capilar

La elevación de la concentración de proteínas en el fluido de LBA asociada a la administración de V_T elevado fue ligeramente menor ($p=0,066$) en el grupo perfundido con KS+S que con KS. Podría especularse, aunque la diferencia no alcanza la significación estadística, que la presencia de elementos sanguíneos podría ejercer un cierto efecto protector sobre la permeabilidad alveolocapilar, atenuando la hiperpermeabilidad en condiciones de VM con V_T elevado.

A este respecto existe escasa bibliografía en la literatura sobre los efectos de sangre en el líquido de perfusión en un modelo de ventilación pulmonar *ex vivo*. Sin embargo, Kraft *et al.* (249) demostraron que pulmones de conejo perfundidos con líquido de perfusión con elementos sanguíneos con un hematocrito de 10 o 20% no desarrollaron edema pulmonar ni aumento de la permeabilidad macromolecular, mejorando la integridad funcional y estructural del pulmón. Nuestros resultados discrepan en el sentido de que nosotros no observamos (en los pulmones sometidos a V_T bajo) una menor concentración de proteínas en el fluido de LBA en presencia de elementos sanguíneos (KS+S) en comparación con ausencia de elementos sanguíneos (KS). La ausencia en nuestro modelo (en pulmones sometidos a V_T bajo) de una menor concentración de proteínas en el LBA en condiciones de perfusión con KS+S *versus* KS puede deberse a la particular composición del líquido de perfusión diseñada en el presente estudio para evitar la formación de edema durante la VM.

Sin embargo, los resultados de Kraft (249) indicando en su modelo un efecto protector de la presencia de sangre en el líquido de perfusión sobre la integridad de la barrera alveolocapilar se encuentran en consonancia con nuestro hallazgo de una menor (sin alcanzar la significación estadística) permeabilidad alveolocapilar en pulmones perfundidos con KS+S en comparación con KS.

Los resultados de una menor elevación de la concentración de proteínas en el LBA al aplicar V_T elevado (en comparación con V_T bajo) en animales perfundidos con elementos sanguíneos puede interpretarse como un efecto protector de los elementos sanguíneos en el líquido de perfusión sobre el aumento de la permeabilidad alveolocapilar inducido por la VM con V_T elevado. Esta interpretación no sólo es concordante con el estudio de Kraft *et al.* (249) sino que también se enmarca adecuadamente en el contexto general de

los resultados del presente estudio. En efecto, el perfil de la respuesta inflamatoria en los pulmones perfundidos con KS+S se puede calificar (*vide infra*) como anti-inflamatorio. En este contexto, es posible que la presencia de elementos sanguíneos atenúe el aumento de la permeabilidad alveolocapilar, explicándose así la menor concentración de proteína en el LBA.

Alternativamente, es posible que el aumento de la presión oncótica asociado a la presencia de elementos sanguíneos en el grupo KS+S mitigue el aumento de la concentración de proteínas en el LBA sin necesidad de invocar un efecto sobre la permeabilidad alveolocapilar. Sin embargo, la presión oncótica se debe fundamentalmente a la concentración de albúmina en el líquido de perfusión y esta concentración fue similar en el grupo KS y en el grupo KS+S. Esta aseveración ha sido mantenida por otros investigadores que también afirman que los hematíes por sí mismos no contribuyen directamente a la presión oncótica del líquido broncoalveolar (249-251). El razonamiento propuesto es que debido al tamaño celular no se alcanza una concentración suficiente para producir algún efecto (249-251).

3.5. Daño celular: actividad de AST, ALT y LDH en el LBA y en el líquido de perfusión

Estudios anteriores han documentado la presencia de daño celular en el contexto de la VM con V_T elevado como se ha descrito en detalle en el cap. 2 (*vide supra*) (186, 187, 189, 194). Nosotros también hemos descrito en el presente modelo, en línea con los hallazgos de otros estudios, cambios indicativos de lesión celular como son el aumento de la actividad de ALT, AST y LDH en el espacio alveolar (186-189, 194).

En el presente capítulo planteamos la hipótesis de que la adición de elementos sanguíneos al líquido de perfusión (KS+S) puede modificar la lesión celular medida mediante la determinación de AST, ALT y LDH en el espacio alveolar (LBA) y en el espacio intravascular (líquido de perfusión). Encontramos cambios marcados en la actividad de estas enzimas en relación con el uso de VM con V_T elevado (*vide supra*) y en relación con la composición del líquido de perfusión (KS *versus* KS+S). A este respecto, no existe bibliografía en la literatura sobre los efectos de la presencia de elementos

sanguíneos en el líquido de perfusión sobre la actividad de las enzimas determinadas en el presente estudio.

La discusión subsiguiente refleja en gran parte la dificultad de interpretar cambios en la actividad enzimática determinada en el LBA y en el líquido de perfusión en el presente modelo. En efecto, en este modelo se combinan varios factores que se ven alterados por la VM con VT elevado o por la composición del líquido de perfusión: daño celular epitelial (que se verá manifestado en el análisis de muestras de LBA), daño celular endotelial (que se verá manifestado en el análisis de muestras de líquido de perfusión), cambios en la permeabilidad alveolocapilar, cambios debidos a la composición del líquido de perfusión *per se* (presencia de elementos sanguíneos) y cambios debidos al trauma sobre los elementos sanguíneos inducidos por el estiramiento tisular en el contexto de la aplicación de VM con VT elevado.

Así pues, los cambios en la actividad de las enzimas determinados (en LBA, en líquido de perfusión o la ratio entre ambos) pueden explicarse por daño celular (en el epitelio o en el endotelio pulmonar), cambios en la permeabilidad alveolo-capilar o lisis de elementos formes presentes en el líquido de perfusión favorecida por el trauma mecánico.

En el **LBA**, la elevación de ALT, AST al administrar VT elevado fue similar en KS que en KS+S, pero la actividad de LDH fue mayor en KS+S que en KS (Fig. 25). Este hallazgo, de difícil interpretación, podría estar relacionado con: (i) la posible hemólisis producida tras someter a los pulmones a VM con VT elevado y translocación de moléculas desde el espacio intravascular hacia el espacio alveolar; (ii) mayor daño epitelial alveolar en presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión.

En el **líquido de perfusión** en los pulmones sometidos a ventilación con **V_T bajo** observamos, en el grupo KS+S en comparación al grupo KS, una elevación de la actividad de AST y LDH pero no de ALT, de acuerdo con el contenido enzimático de los elementos formes de la sangre (Fig. 25).

En el líquido de perfusión, el aumento significativo de la actividad enzimática al aplicar **V_T elevado** (en comparación con VT bajo) en el grupo KS+S, se había observado también en el grupo KS. Sin embargo, el aumento de la actividad de las tres enzimas en los pulmones sometidos a VT elevado fue mayor en pulmones perfundidos con elementos sanguíneos (KS+S) que en pulmones perfundidos con KS. Este aumento puede atribuirse a: (i) paso

de moléculas del espacio intersticial y alveolar hacia el espacio intravascular; (ii) mayor daño endotelial inducido por la VM en presencia de elementos sanguíneos; (iii) hemólisis de los elementos formes presentes en el líquido de perfusión debida al trauma mecánico inducido por la VM con V_T elevado. Este aumento en el líquido de perfusión de pulmones sometidos a VM con V_T elevado fue muy marcado, alcanzando una actividad enzimática mayor que la detectada en el espacio alveolar. Este hallazgo apoya la hipótesis de que los cambios en el líquido de perfusión se deben a lisis de elementos formes durante la aplicación de VM con V_T elevado y que los cambios detectados en el LBA son secundarios a los observados en el líquido de perfusión.

La ratio LBA/líquido de perfusión en KS+S en condiciones de **V_T bajo** (en comparación con el grupo KS) fue menor para AST y LDH (pero no fue diferente para la ALT), apoyando que la disminución de la ratio es debida a un aumento de la actividad en el líquido de perfusión en el contexto del contenido enzimático de los elementos sanguíneos que sufren lisis (ricos en AST y LDH pero no en ALT).

La ratio LBA/líquido de perfusión de ALT y LDH en el grupo KS+S en condiciones de **V_T elevado** (que había aumentado en pulmones perfundidos con KS y ventilados con VT elevado en comparación con V_T bajo) aumentó en menor medida en los pulmones perfundidos con KS+S (en comparación con los pulmones perfundidos con KS) al comparar V_T elevado con V_T bajo. Esta falta de aumento de la ratio LBA/líquido de perfusión puede explicarse por un aumento del denominador de la ratio (actividad en líquido de perfusión) debido (*vide supra*) a varias causas posibles.

El paso de moléculas del espacio alveolar hacia el espacio intravascular puede explicar la falta de aumento de la ratio al aplicar VT elevado en condiciones de perfusión con KS+S. Esta explicación resulta improbable puesto que la actividad de las tres enzimas (en el líquido de perfusión de los pulmones ventilados con VT elevado) es superior en el líquido de perfusión que en LBA (la ratio es < 1). No es plausible que esta elevación en el líquido de perfusión proceda del LBA (lo cual requeriría una translocación contra gradiente de concentración de las moléculas).

Otra explicación es el desarrollo de lesión endotelial inducida por la VM más marcada en condiciones de perfusión con KS+S que con KS.

Finalmente, el hallazgo podría explicarse también por un efecto mecánico de la VM con VT elevado, aumentando la hemólisis de elementos formes sanguíneos presentes en el líquido de perfusión.

En resumen, los resultados descritos en pulmones perfundidos con KS+S son de compleja interpretación. No obstante, permiten alcanzar ciertas conclusiones.

Primero, la determinación de la actividad enzimática de ciertas enzimas de localización intracelular, como la ALT, AST y LDH, en el LBA es útil para evaluar el daño pulmonar inducido por la VM daño que puede ser de origen epitelial o endotelial.

Segundo, la determinación en el líquido de perfusión resulta menos útil, pues su interpretación es problemática y no permite atribuir los cambios observados a ningún mecanismo específico. En efecto, varias explicaciones plausibles pueden dar cuenta de cambios en la actividad enzimática en el líquido de perfusión. Por ejemplo, el hallazgo de una mayor actividad en el líquido de perfusión en ciertas condiciones (VM con VT elevado *versus* VT bajo, o ventilación con líquido de perfusión KS+S *versus* KS) puede obedecer a diferentes mecanismos. Estos mecanismos incluyen: una mayor lesión celular en los tipos celulares en contacto con el espacio intravascular, es decir, las células endoteliales; un aumento de la permeabilidad alveolocapilar que permita un mayor paso de moléculas desde el espacio intersticial o alveolar hacia el espacio intravascular; y lisis de elementos formes presentes en el líquido de perfusión KS+S debida al trauma mecánico asociado al estiramiento tisular durante la VM con VT elevado. Como se ha discutido en detalle más arriba, se propone la lisis de elementos formes en el líquido de perfusión asociada el trauma mecánico como el mecanismo más plausible explicativo de los cambios observados.

3.6. Equilibrio ácido-base

La documentación de los cambios en el equilibrio ácido-base es fundamental para una correcta interpretación de las determinaciones relacionadas con la respuesta inflamatoria y la expresión génica, que son dependientes de las condiciones de pH. Como se discutió más arriba, la VM con VT elevado en condiciones de perfusión con KS no indujo cambios significativos en las variables de equilibrio ácido-base. Asimismo, la ventilación *ex vivo* utilizando KS+S como líquido de perfusión, en comparación con la utilización de KS, no se

asoció con ningún cambio en las variables relacionadas con el equilibrio ácido-base ni con la PO₂ en condiciones de control (ventilación con VT bajo) ni se asoció con cambios en la respuesta a la VM con VT elevado (Tabla 4).

Los resultados discutidos en el presente apartado son de gran importancia para documentar la validez del modelo. En efecto, si se hubieran detectado cambios en el pH o en las condiciones del equilibrio ácido-base, se podría argumentar que los cambios medidos en las variables indicativas de la respuesta inflamatoria podrían deberse a cambios en las condiciones de pH más que a cambios inducidos por la VM. La constancia de las condiciones de pH en todos los grupos, independientemente de la aplicación de VM con VT elevado o de la composición del líquido de perfusión (presencia de elementos sanguíneos) hace posible que se pueda atribuir los cambios detectados en la respuesta inflamatoria al estiramiento tisular en el contexto de la administración de un VT elevado. No existe bibliografía en la literatura que valore el efecto de la adición de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión sobre equilibrio ácido-base en un modelo de ventilación pulmonar *ex vivo* que nos permita comparar nuestros resultados.

3.7. Inflamación pulmonar: Concentración de citoquinas y expresión génica

Hemos identificado (*vide supra*) el patrón de respuesta inflamatoria inducido por la VM con VT elevado, caracterizado por un aumento de la concentración de IL-6 y (sin alcanzar la significación estadística) IL-10, acompañado por una disminución (sin alcanzar la significación estadística) de la concentración de MCP-1 y MIP-2. La expresión génica de MCP-1, MIP-2 y (sin alcanzar la significación estadística) de IL-6, IL-10 y TNF- α aumentó al aplicar VM con VT elevado. Se apreció, como se ha discutido en detalle más arriba, una concordancia en los cambios en la concentración de proteína y en la expresión génica de IL-6 y IL-10, pero ambos cambios fueron discordantes para la MCP-1 y MIP-2.

Ya se ha discutido el perfil de respuesta inflamatoria inducido por la VM descrito en la presente investigación en el contexto de la literatura de daño pulmonar inducido por la VM. Es pertinente aquí describir y discutir la modulación, si existe, de la respuesta inflamatoria inducida por la VM dependiendo de la composición del líquido de perfusión (presencia o ausencia de elementos sanguíneos).

La perfusión con KS+S, en comparación con KS, modificó la concentración de citoquinas y la expresión génica en condiciones basales (ventilación con VT bajo). En efecto, el grupo KS+S presentó, en comparación con el grupo KS, una menor concentración de MCP-1 y (sin alcanzar la significación estadística) de MIP-2. Asimismo, la expresión génica de MCP-1, MIP-2 y TNF- α fue ligeramente menor en el grupo KS+S en comparación con el grupo KS (sin alcanzar la significación estadística).

Se puede concluir pues, que, en condiciones basales (ventilación con VT bajo) la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión se asocia con un efecto anti-inflamatorio.

El presente diseño permite, no sólo el análisis de la modulación de la respuesta inflamatoria por la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (KS *versus* KS+S) en pulmones ventilados *ex vivo* en condiciones control (VT bajo), sino también el efecto de la perfusión con KS+S en la respuesta inflamatoria inducida por la VM con VT elevado. Los cambios encontrados son concordantes con los descritos en pulmones ventilados con VT bajo.

En efecto, el aumento inducido por la VM con VT elevado en la concentración de IL-6 en pulmones perfundidos con KS fue atenuado en los pulmones perfundidos con KS+S. Por otro lado, el aumento de IL-10 alcanzó la significación estadística en el grupo KS+S ($p=0,02$) pero no en el grupo KS ($p=0,06$). Asimismo, el aumento de la expresión génica de los genes IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-2, TNF- α fue atenuado por la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión (alcanzando la significación estadística para el gen de MCP-1 y MIP-2).

Así pues, los cambios encontrados en la respuesta inflamatoria inducida por la aplicación de VM con VT elevado entre el grupo KS y el grupo KS+S apuntan todos en la misma dirección.

En combinación con los hallazgos en pulmones ventilados con VT bajo, la modulación de la respuesta inflamatoria asociada a la perfusión con KS+S *versus* KS al aplicar VM con VT elevado nos permite concluir que la adición de elementos sanguíneos al líquido de perfusión se asocia con un efecto anti-inflamatorio. Este efecto se aprecia tanto en condiciones basales (ventilación con VT bajo) como en la atenuación de la respuesta a VM con VT elevado.

Nuestros hallazgos de un efecto modulador de la respuesta inflamatoria por la presencia de elementos sanguíneos ante un estímulo inflamatorio (la VM con VT elevado) están en consonancia con los efectos previamente conocidos de la sangre en otros modelos de inflamación (20) o en ciertas condiciones clínicas (20).

El abordaje más fisiológico para los estudios pulmonares *ex vivo* es el sistema corazón-pulmón autoperfundido descrito por primera vez por Starling (266) en 1920 y posteriormente modificado por Robicsek *et al.* (267) a finales de los años 60. Desde que se observó la susceptibilidad del sistema vascular-pulmonar a la composición del líquido de perfusión y el desarrollo de edema pulmonar (268), el periodo de observación estable fue más corto. El uso de sangre en lugar de cristaloideos fue publicado por Wang *et al.*, Semik *et al.* y DeCampos *et al.* (269-271). Sin embargo, sus modelos carecen de perfusión pulsátil que es bien conocido como causante de vasoconstricción y edema (269-271). Teóricamente, el flujo pulsátil debería ser el método de elección tal y como hemos utilizado en nuestro modelo.

La presencia de hematíes no se considera únicamente como importante para el transporte de hemoglobina sino que es considerado como un elemento responsable de la atenuación del daño pulmonar (272).

Los efectos de la transfusión de sangre en las funciones del sistema inmunológico han sido estudiados en humanos y animales de laboratorio. La sangre ejerce un efecto "inmunomodulador", suprimiendo elementos de la respuesta inmune. Estos efectos están mediados por leucocitos presentes en los componentes de la sangre y están relacionados con la expresión de antígenos HLA clase I y clase II en los leucocitos. También pueden contribuir a este efecto el plasma, las plaquetas o los eritrocitos. Estudios en animales y en humanos han demostrado disminución de la secreción de IL-2 (55), de la actividad de las células NK (273), de la ratio CD4 / CD8 (274) y de la función de los macrófagos (275-277).

El efecto de la composición del líquido de perfusión que describimos puede interpretarse en el contexto del efecto anti-inflamatorio de los elementos sanguíneos. En efecto, un perfil de expresión génica y de concentración de citoquinas más anti-inflamatorio se puede asociar con una menor activación de macrófagos y, consiguientemente, menor reclutamiento de PMNs y menor hiperpermeabilidad alveolo capilar (180-183).

La presente memoria describe aspectos esenciales de la respuesta pulmonar a la VM y la modulación de esta respuesta por la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión. El hallazgo de un efecto anti-inflamatorio asociado a la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión en el presente modelo de ventilación *ex vivo* de pulmones perfundidos es importante por dos razones. Primero, este hallazgo es relevante para el conocimiento de los efectos de los elementos sanguíneos sobre la respuesta inflamatoria en un modelo de daño pulmonar, caracterizado por inflamación del órgano. Segundo y en el contexto de la presente memoria, el hallazgo reportado es también importante para conocer las características del modelo y el diferente perfil de respuesta inflamatoria dependiendo de las condiciones de la composición del líquido de perfusión (ausencia o presencia de elementos sanguíneos). Este conocimiento es esencial para el diseño de experimentos y para el planteamiento de hipótesis utilizando el modelo de ventilación *ex vivo* de pulmones perfundidos.

3.8. Nitración de proteínas y estrés oxidativo

La nitración de proteínas es un marcador de la presencia de peroxinitrito formado en condiciones de inflamación al reaccionar el radical superóxido con el óxido nítrico (NO) (100, 155). Ambas especies se encuentran en elevadas concentraciones en el contexto de inflamación, como es característico del presente modelo. En efecto, nosotros hemos demostrado previamente en un modelo de daño pulmonar inducido por la VM *in vivo* aumento de la nitración de proteínas (estrés nitrosativo) y del estrés oxidativo (estrés nitro-oxidativo) (102).

En discordancia con nuestros resultados en el modelo *in vivo*, no hemos encontrado aumento del estrés nitro-oxidativo en tejido pulmonar en el modelo *ex vivo*. Las causas de esta discrepancia se han discutido en detalle más arriba en la discusión sobre los resultados obtenidos en los pulmones sometidos a VM con VT elevado y perfundidos con KS. Estas causas tienen más relación probablemente con el curso temporal de los eventos y, quizá principalmente, con la necesaria contribución de otros órganos o tipos celulares además de los presentes en el pulmón exangüe, a la generación de la respuesta

celular a un insulto como es en este caso el estrés nitro-oxidativo en respuesta a la VM con VT elevado.

Sin embargo, en los pulmones perfundidos con KS+S hemos demostrado, a diferencia de los pulmones perfundidos con KS, un aumento significativo del estrés oxidativo (fluorescencia a DHE) y del estrés nitrosativo (inmunofluorescencia a 3-Nitro-Tyr y Western blot para proteínas nitradas) en pulmones ventilados con VT elevado. Este hallazgo, en el contexto del interés general de los resultados presentados en la presente memoria, resulta de gran importancia para el diseño experimental y el estudio del daño pulmonar utilizando el presente modelo de ventilación *ex vivo*.

Nuestros resultados documentan la necesidad de la presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión para desarrollar un aumento del estrés nitro-oxidativo como respuesta a la VM con VT elevado. Es fisiológicamente plausible proponer, como indican nuestros resultados, la necesidad de las células inflamatorias de la sangre para el desarrollo de estrés nitro-oxidativo durante el insulto biomecánico.

Nuestros resultados se encuentran en consonancia con los estudios de Fukuse *et al.* (250, 251) en un modelo *ex vivo* de corazón-pulmón en rata en el cual se demostró menor formación de edema pulmonar tras la adición de elementos sanguíneos al líquido de perfusión, en comparación con la perfusión con KS.

El hallazgo de aumento del estrés nitro-oxidativo en respuesta a la VM con VT elevado sólo en el caso de perfusión con elementos sanguíneos ha de ser discutido en consideración a los hallazgos sobre otros efectos de la composición del líquido de perfusión sobre la respuesta inflamatoria a la VM con VT elevado. En efecto, como se ha mencionado anteriormente, el grupo KS+S presentó un perfil de respuesta inflamatoria a la VM con VT elevado caracterizado por una menor respuesta inflamatoria en comparación con el grupo perfundido sin elementos sanguíneos. Paralelamente y aparentemente de forma paradójica, el estrés nitro-oxidativo es mayor en el grupo perfundido con KS+S.

La explicación más plausible de esta aparente discrepancia puede tener relación con el curso temporal de los eventos y con las diferentes citoquinas que tienen un papel en los diferentes fenómenos. Es posible que el estrés nitro-oxidativo coincida con un aumento de la expresión de NO sintasa y de enzimas implicados en la generación de radicales libres

de oxígeno (e.g., la NADPH oxidasa), aun cuando el perfil de las citoquinas determinadas en la presente investigación indique un perfil en general anti-inflamatorio. Por otro lado, también es posible que una mayor concentración de citoquinas en momentos anteriores del tiempo de VM (antes de T=2,5 h) demuestre un aumento de la concentración de citoquinas que explique el aumento del estrés nitro-oxidativo, aun cuando en el momento final del experimento (T=2,5 h) el perfil de la concentración de citoquinas haya cambiado.

En resumen, el hallazgo de un aumento del estrés nitro-oxidativo en pulmones sometidos a VM con VT elevado y perfundidos con KS+S (pero no en pulmones perfundidos con KS), exige tres explicaciones. Primero, la ausencia de estrés nitro-oxidativo en pulmones perfundidos con KS, mientras que *in vivo* se ha demostrado por otros autores (100, 155, 215, 239, 243) y por nuestro equipo (102, 139, 130) un aumento del estrés nitro-oxidativo en respuesta a la VM con VT elevado. Segundo, la presencia de estrés nitro-oxidativo en presencia (pero no en ausencia) de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión en nuestro estudio. Tercero, la coincidencia de aumento del estrés nitro-oxidativo con una disminución de la respuesta inflamatoria a la VM con VT elevado.

Proponemos tres respuestas a las preguntas planteadas. Primero, la diferencia entre los resultados *in vivo* y *ex vivo* se explica por la necesaria contribución de elementos celulares ajenos al pulmón exangüe para el desarrollo de estrés nitro-oxidativo ante el estímulo de la VM. Segundo, la demostración de estrés nitro-oxidativo en el grupo KS+S pero no en el grupo KS se explica porque tipos celulares presentes en la sangre, entrando en contacto con el pulmón a través del líquido de perfusión, son suficientes para facilitar el desarrollo del estrés nitro-oxidativo. Tercero, la coincidencia del estrés nitro-oxidativo con una respuesta aparentemente anti-inflamatoria a la VM con VT elevado se explica por un diferente curso temporal entre la respuesta inflamatoria y el desarrollo del estrés nitro-oxidativo o bien un diferente curso temporal entre la expresión de las citoquinas analizadas en la presente investigación y otras enzimas implicados en la formación de radicales libres de oxígeno y de peroxinitrito.

4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 4: DEMOSTRAR QUE EL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA SE ASOCIA CON DISFUNCIÓN EN OTROS ÓRGANOS

El presente diseño experimental *ex vivo* se completó mediante el diseño de un bioensayo para valorar los efectos biológicos del líquido de perfusión condicionado. Es decir, líquido de perfusión que ha circulado a través del pulmón durante el tiempo de VM con VT elevado.

Anillos de aorta procedentes de animales que no habían sido sometidos a VM fueron incubados con el líquido de perfusión condicionado (procedente de pulmones sometidos a VM con VT bajo o VT elevado) con el objeto de demostrar los efectos biológicos del líquido de perfusión sobre la función vascular.

El estudio de este aspecto de la patogénesis del DPA (*cross-talk* pulmón-órganos no pulmonares) es de gran relevancia clínica pues el fracaso de órganos en el contexto de la respuesta inflamatoria que acompaña a la DPA es la causa de muerte más frecuente de los pacientes con DPA y SDRA (41, 69, 87, 94, 119, 120, 124, 127, 220).

Los anillos de aorta incubados durante 30 min o 60 min con el líquido de perfusión mostraron: (i) deterioro de la respuesta a NA (tanto con líquido de perfusión procedente del grupo ventilado con VT bajo como, y en igual magnitud, con líquido de perfusión procedente de pulmones sometidos a VT alto, y con sólo 30 min de tiempo de incubación); y (ii) deterioro de la respuesta a Ach (sólo con líquido de perfusión procedente de pulmones sometidos a VT elevado y sólo tras 60 min de incubación).

Esta disfunción vascular de la función contráctil y de la función endotelial (respuesta contráctil a noradrenalina y de la respuesta relajadora a acetilcolina) nos ha permitido probar, por tanto, la hipótesis de que el pulmón en condiciones de DPA genera una respuesta inflamatoria produciendo mediadores que son liberados a la circulación y afectan a la función de otros órganos o sistemas (el sistema vascular en nuestro caso).

Este abordaje de bioensayo utilizando el modelo *ex vivo* tiene una particular relevancia traslacional, pues permite sustanciar además la hipótesis del pulmón como motor del fracaso multiorgánico. Es decir, del pulmón como causa (cuando es sometido a determinadas condiciones ventilatorias) de la disfunción de otros órganos o sistemas.

El bioensayo como diseño experimental para demostrar los efectos del tejido pulmonar lesionado por la VM en la función de otros órganos ha sido empleado previamente por Copland *et al.* (19). En este estudio demostraron que mediadores circulantes (citoquinas entre otros) contribuyen al desarrollo del daño pulmonar en condiciones de VM con VT elevado. Para ello utilizaron un modelo de VILI de pulmón aislado perfundido en ratones. En primer lugar concluyeron que, en pulmones aislados de ratón ventilados con VT elevado y perfundidos, la recirculación del perfundido empeoró la lesión produciendo un deterioro de la *compliance*, un aumento de la permeabilidad microvascular y edema inducido por la alta VT. En segundo lugar, el líquido de perfusión recogido de pulmones ventilados con alta VT y utilizados para perfundir pulmones ventilados con VT bajo causó deterioro de la *compliance* y la permeabilidad. Por último, para determinar el impacto del líquido de perfusión proveniente de pulmones ventilados con VT elevado sobre la integridad de la barrera epitelial alveolar, se utilizaron células fetales epiteliales pulmonares distales cultivadas en las que se causó un deterioro de la resistencia eléctrica transepitelial.

Los principales puntos de vista de este estudio son paralelos a los obtenidos en nuestro estudio y se describen, a su vez, para la satisfacción de los postulados de Koch (165). En primer lugar, hemos demostrado la presencia de una "asociación positiva". La ventilación con VT elevado causa lesión pulmonar. En segundo lugar, se verificó la presencia de una "asociación negativa". Aunque la ventilación con VT bajo produce algunas respuestas inflamatorias (es decir, citoquinas elevadas), esto no fue suficiente para causar disfunción pulmonar. En tercer lugar, nos confirmó un "efecto transferible". El líquido de perfusión de los pulmones ventilados con una estrategia de ventilación perjudicial dio lugar a varios efectos importantes en nuestro caso sobre la función vascular como son la alteración de la función contráctil y de la función endotelial.

Es de notar que en el caso de la disfunción del músculo liso (deterioro de las respuestas a NA), el líquido de perfusión procedente de pulmones sometidos a VT bajo produce

disfunción vascular y esta disfunción es de la misma magnitud que la originada por el líquido de perfusión procedente de pulmones con VT elevado. En cualquier caso, se cumple el postulado pues el líquido de perfusión que no ha circulado por el pulmón se asocia con mejores respuestas que el que ha circulado (aunque sea utilizando el protocolo de VT bajo).

El objetivo planteado en esta serie de experimentos utilizando el bioensayo se limita a demostrar la relación entre el DPA y el daño en la función de otros órganos, el vascular en este caso. No se ha investigado el efecto de la composición del líquido de perfusión. Tampoco se diseñaron experimentos para investigar la naturaleza del mediador bioquímico ni los mecanismos implicados en la disfunción vascular, limitándose el objetivo a la demostración de la disfunción vascular *per se*.

El papel del estrés nitro-oxidativo y la respuesta inflamatoria en el DPA inducido por la VM parece no estar limitado al daño pulmonar *per se*, como se comentó anteriormente. En este sentido, se ha postulado que variaciones en los niveles de radicales libres y en la respuesta inflamatoria pueden ser responsables de la disfunción vascular y sistémica observada en el DPA y en el VILI. El endotelio vascular tiene un papel clave en el desarrollo del DPA. La alteración de la integridad epitelial origina exposición de estructuras de la matriz extracelular que interaccionan con macrófagos alveolares, exacerbando la respuesta inflamatoria. Los macrófagos alveolares también secretan citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL 10, TNF- α) que estimulan la quimiotaxis y activan los neutrófilos, células clave según algunos autores en la respuesta pulmonar en el VILI (180-183). Este conocimiento es el fundamento de numerosos ensayos clínicos en los que se ha probado, aunque con resultados negativos, la eficacia de diferentes intervenciones anti-inflamatorias en el DPA y SDRA (115, 163, 167).

Los resultados del presente estudio sobre la disfunción vascular *in vitro* inducida por el líquido de perfusión procedente de pulmones sometidos *ex vivo* a DPA está en consonancia con nuestros resultados previos en los que demostramos disfunción vascular *in vitro* de vasos procedentes de animales sometidos *in vivo* a VILI (111). En estos estudios documentamos que los anillos de aorta de rata sometida *in vivo* a VM con VT elevado presentaban disfunción del músculo liso y endotelial que mejora tras el tratamiento *in vitro* con MnTMPyP y con tempol, apoyando el concepto de que la

Discusión

formación de radicales libres y de peroxinitrito tienen un papel en la disfunción de órganos (vascular en este caso) asociada al daño pulmonar inducido por la VM (74, 102, 111, 115).

5. DISCUSIÓN DE LIMITACIONES DEL ESTUDIO

5.1.1. Limitaciones generales del modelo

Un modelo experimental debe reproducir los cambios característicos de un síndrome o condición clínico-patológica tal como se identifica en pacientes. Actualmente ningún modelo experimental DPA cumple perfectamente esta condición como resumimos posteriormente (*vide infra*). En el caso que nos ocupa, la imperfección principal del modelo está relacionada en parte con el tipo de daño y por otra parte con la duración del tiempo de VM (que es de corta duración en relación a la situación encontrada en la clínica humana).

Respecto al tipo de daño, en efecto, los pacientes no desarrollan DPA sólo en el contexto del uso de VM utilizando VT elevados como se aplica en nuestro modelo, sino más bien en condiciones de una inflamación pulmonar o no pulmonar (e.g., neumonía, pancreatitis, infección no pulmonar, trauma sistémico, etc.). Por otro lado, el modelo animal no reproduce la comorbilidad presente con frecuencia en pacientes, que suelen presentar enfermedades pulmonares subyacentes u otras comorbilidades como diabetes, enfermedad coronaria, insuficiencia renal o hepática. Los estudios en animales suelen realizarse frecuentemente usando ratas jóvenes sin ninguna enfermedad. Los animales pequeños y jóvenes parecen más susceptibles a los efectos deletéreos de la presión elevada en la vía aérea, probablemente por inmadurez de la barrera alveolocapilar (82, 84, 168, 278). Por tanto, en el caso humano, la VM puede tener un papel en la causa del DPA en combinación con otras causas no representadas en el modelo animal.

Otro dato a tener en cuenta es el uso en nuestro modelo de VT muy elevados (e.g., 25 ml/kg) para inducir daño pulmonar inflamatorio, mientras que en la clínica VT tan elevados no son utilizados. Sin embargo, hay que argumentar que los modelos animales tratan de reproducir los cambios encontrados en pacientes de una forma exagerada. En efecto, el uso de VT en el rango de los utilizados en la clínica y lo suficientemente elevados como para inducir VILI en pacientes (e.g., quizá VT =10-12 ml/kg) no produciría un daño significativo en ratas.

Otras limitaciones del modelo se encuentran relacionadas con la forma de administrar la VM y el daño pulmonar con el que esta intervención puede asociarse en el grupo control (VT bajo). La VM es una intervención terapéutica esencial para pacientes con DPA. Sin embargo, el uso de la VM puede asociarse per se con daño pulmonar, tal como es el tema de la presente investigación. Numerosas variables han de tenerse en cuenta, como el modo ventilatorio y el tipo de ventilador, para reproducir la situación clínica y para producir resultados reproducibles dentro del modelo animal. Asimismo, otros aspectos han de ser semejantes en el modelo animal y en humanos, como la monitorización fisiológica, el mantenimiento de la temperatura corporal o el mantenimiento hídrico.

Otra diferencia entre el modelo animal y los humanos es la frecuencia respiratoria, marcadamente más elevada en el modelo animal que en humanos (80-120 rpm *versus* 12-20 rpm) así como las diferencias en la anatomía macroscópica y microscópica entre humanos y roedores. Tanto los alveolos como el espesor de la membrana alveolo-capilar son mucho más reducidos en ratas que en humanos. La anatomía lobular es distinta, con menos ramificaciones de los conductos aéreos proximales a bronquiolos en el caso de las ratas (279).

Desde el punto de vista microscópico, las ratas poseen un mayor número de células Clara en sus conductos distales, un amplio tejido linfoide bronquial asociado a él y una ausencia de glándulas submucosas en la zona proximal de la tráquea (279).

Otra limitación de los modelos se encuentra en relación con diferencias inter-especie en los mecanismos implicados en la respuesta inmune innata (279).

Por todas estas razones no es de esperar que las respuestas animales y humanas sometidas a un estímulo deletéreo sean idénticas y la extrapolación de los mecanismos fisiopatológicos del VILI experimental al SDRA humano debe realizarse con mucho cuidado.

Finalmente, la mayoría de los modelos se centran en el estudio de un tejido (e.g., el epitelio alveolar o el endotelio alveolar), mientras que el tejido diana del VILI en pacientes no ha sido todavía identificado.

Para terminar, la cronopatía es diferente en las diferentes especies animales. En animales pequeños, la VM produce edema rápidamente fatal, mientras que en pacientes el daño se presenta típicamente de forma subaguda a lo largo del tiempo de VM.

Por lo comentado anteriormente, encontramos que muy pocos modelos animales son capaces de reproducir o presentar todas las características del SDRA humano y que la mayoría de los modelos existentes son relevantes sólo para un limitado número de aspectos del DPA/SDRA humano.

La literatura demuestra que la mayoría de los modelos están basados en uno, o como máximo, en dos métodos para causar daño pulmonar, mientras que el SDRA en humanos es rara vez causado por un único causante. Sin embargo, si las características del modelo animal están bien sustentadas y los resultados son interpretados dentro de los límites específicos del modelo, los estudios animales pueden ofrecernos una valiosa información para contestar a preguntas bien formuladas sobre el daño pulmonar humano.

A pesar de sus limitaciones, los modelos animales, por tanto, son necesarios para el avance del conocimiento de la enfermedad y los resultados pueden resultar válidos si la variable de interés es reproducida en el modelo y si la interpretación de los resultados considera las limitaciones del modelo.

5.1.2. Limitaciones específicas del modelo *ex vivo*

Como con todos los modelos, este modelo *ex vivo* presenta sus limitaciones inherentes. La principal en nuestro contexto es la situación de isquemia que sufre el pulmón durante el tiempo de VM, lo cual es claramente diferente de la situación *in vivo*. Sin embargo, investigaciones previas han indicado que los resultados procedentes del modelo *ex vivo* pueden ser reproducidos en modelos *in vivo*. Además, estudios anteriores han demostrado que los pulmones de ratas son todavía viables y capaces de permitir un intercambio de gases adecuado tras períodos de isquemia de hasta 3h en condiciones de normotermia (280).

La segunda posible limitación (*vide supra*) es el uso de VT muy elevados, nunca utilizados en la clínica. De hecho, otros estudios han demostrado cambios significativos en los mecanismos pulmonares y los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el LBA utilizando VT más bajos que los utilizados en nuestro estudio (e.g., 15 ml/kg) (120). Sin embargo, el VT utilizado en el presente estudio se encuentra en el rango utilizado en otras investigaciones donde se han administrado VT en el rango de 20 ml/kg a 42 ml/kg (74, 94, 111, 115, 127, 129, 280, 281).

Por último, entre otras limitaciones, la intubación endotraqueal se asocia con una menor respuesta inflamatoria que la traqueotomía. En nuestro modelo se hace necesario la realización de una traqueotomía al tratarse de un modelo *ex vivo* en el que debemos separar en bloque la pieza corazón-pulmón y posteriormente adaptarlo al ventilador. La técnica quirúrgica para realizar este paso requiere suturar la tráquea al tubo endotraqueal aun cuando sea posible una liberación de mediadores inflamatorios.

5.2. Potenciales bondades del modelo *ex vivo*

Se ha escogido este modelo de pulmón perfundido aislado *ex vivo* con el fin de aislar los fenómenos ocurridos en el pulmón de influencias sistémicas. Utilizamos por tanto este modelo para descartar el papel de cambios relacionados con la aplicación de VM con VT elevado que pueden interferir en las mediciones de forma ajena al efecto de los cambios en el pulmón *per se* relacionados con el stretch (e.g., cambios que son consecuencia de los efectos de la VM con VT elevado en otros órganos en el contexto de aumentos marcados de la presión intratorácica con el consiguiente cambio en las condiciones de precarga y de gasto cardíaco y presión de perfusión). Por ejemplo, nosotros hemos demostrado previamente el desarrollo de hipotensión progresiva durante el período de VM aplicando un VT elevado (111, 115, 157), siendo difícil discriminar si este cambio se debe a un efecto inflamatorio generado por el pulmón o bien a cambios en la precarga relacionados con el aumento de la presión intratorácica en el contexto de la VM con VT elevado.

El modelo *ex vivo* permite también utilizar estrategias de ventilación con VT muy elevados que pueden no ser aplicables *in vivo* y que proporcionan conocimiento sobre algunos mecanismos de lesión pulmonar.

Los cambios respiratorios que se producen en el DPA en el presente modelo se encuentran, por tanto, según nuestra tesis, mediados por inflamación, como se ha observado en trabajos anteriores, *in vivo* y *ex vivo* (70, 74, 94, 115, 118-120, 122, 123, 125). En trabajos *in vivo* realizados por nuestro grupo hemos podido comprobar el desarrollo de cambios sistémicos (hipotensión, disfunción vascular *in vitro*, inflamación no-

pulmonar, estrés nitro-oxidativo en diferentes órganos) inducidos por la VM utilizando VT elevado (74, 75, 102, 111, 115, 148).

En resumen, el modelo de ventilación pulmonar *ex vivo* es válido para el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de DPA inducido por la VM con VT elevado pues reproduce los cambios característicos del DPA en pacientes: cambios en la mecánica pulmonar, cambios histológicos característicos (DAD), lesión celular y respuesta inflamatoria. Por otro lado, hemos demostrado la relevancia de la composición del líquido de perfusión (sin *versus* con elementos sanguíneos) en la respuesta a la VM con VT elevado. Finalmente, hemos demostrado que el daño pulmonar inducido por la VM se asocia también con daño cardiovascular (disfunción vascular contráctil y endotelial). Este hallazgo confirma que algunos de los cambios descritos en la función de otros órganos (e.g, el cardiovascular, manifestado como hipotensión y disfunción vascular contráctil y endotelial) en modelos *in vivo* se explican por la liberación por el tejido pulmonar de mediadores que inducen disfunción de órganos y no por otros cambios que se pueden encontrar en el contexto de las oscilaciones de la presión intratorácica y que son ajenos al daño pulmonar *per se* inducido por la VM.

Conclusiones

1. Se ha diseñado un modelo de daño pulmonar agudo inducido en pulmones de rata ventilados *ex vivo* con un V_T elevado, caracterizado por deterioro de las propiedades mecánicas del pulmón, hiperpermeabilidad alveolocapilar, lesión celular, y cambios histológicos consistentes con el desarrollo de daño alveolar difuso.
2. La ventilación mecánica con V_T elevado induce una respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar.
3. La presencia de elementos sanguíneos en el líquido de perfusión modifica la respuesta pulmonar a la ventilación mecánica con V_T elevado: aumenta la respuesta anti-inflamatoria, y se asocia con un aumento del stress nitro-oxidativo.
4. El pulmón sometido a ventilación mecánica con V_T elevado libera mediadores que inducen *in vitro* disfunción vascular, documentando así un *cross-talk* entre el pulmón y el sistema vascular

Bibliografía

Bibliografía

1. Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F. Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(4):1076-81.
2. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(4):443-8.
3. Stapleton RD, Wang BM, Hudson LD, Rubenfeld GD, Caldwell ES, Steinberg KP. Causes and timing of death in patients with ARDS. *Chest* 2005;128(2):525-32.
4. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, Saturday 12 August 1967. *Crit Care Resusc*. 2005;7(1):60-1.
5. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care*. 1994;9(1):72-81.
6. Thompson BT, Moss M. A new definition for the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(4):441-7.
7. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526-33.
8. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, Cortés-Puch I, Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(7):761-7.
9. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, Brochard L, Brower R, Esteban A, Gattinoni L, Rhodes A, Slutsky AS, Vincent JL, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ranieri VM. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012;38(10):1573-82.
10. Villar J1, Kacmarek RM.. The American-European Consensus Conference definition of the acute respiratory distress syndrome is dead, long live positive end-expiratory pressure!. *Med Intensiva*. 2012 Nov;36(8):571-5.
11. Esteban A, Fernandez-Segoviano P, Frutos-Vivar F, Aramburu JA, Najera L, Ferguson ND, Alía I, Gordo F, Ríos F. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Ann Intern Med*. 2004; 141(6):440-5.
12. Peñuelas O, Esteban A, Frutos-Vivar F, Aramburu J. [Validity of the diagnostic criteria of the acute respiratory distress syndrome]. *Med Intensiva*. 2006;30:212-7.
13. Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol*. 1976;85(1):209-28.
14. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*. 2000;21(3):435-66.
15. Katzenstein AA, Askin FB. Surgical pathology of non-neoplastic lung disease. *Major Probl Pathol*. 1982;13:1-430.
16. Tejerina E, Esteban A, Fernández-Segoviano P, María Rodríguez-Barbero J, Gordo F, Frutos-Vivar F, Aramburu J, Algaba A, Gonzalo Salcedo García O, Lorente JA. Clinical diagnoses and autopsy findings: discrepancies in critically ill patients*. *Crit Care Med*. 2012;40(3):842-6.

Bibliografía

17. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez JM, Aramburu JA, Vargas-Errázuriz P, Martín-Pellicer A, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med*. 2013;1(5):395-401.
18. Muscedere JG, Mullen JB, Gan K, Slutsky AS. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1327-34.
19. Copland IB, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J, Post M. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(9):1051-9.
20. Frutos-Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*. 2004;10(1):1-6
21. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F; ALIVE Study Group. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med*. 2004;30(1):51-61.
22. Arroliga AC, Ghamra ZW, Perez Trepichio A, Perez Trepichio P, Komara JJ, Jr., Smith A, Wiedemann HP. Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. *Chest*. 2002;121(6):1972-6.
23. Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Saenz G, Moseinco M, Pozo M, Gómez A, Baredes N, Jannello G, Osatnik J. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002;30(11):2450-6.
24. Manteiga Riestra E, Martínez González O, Frutos Vivar F. [Epidemiology of acute pulmonary injury and acute respiratory distress syndrome]. *Med Intensiva*. 2006;30(4):151-61.
25. Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(1):3-11.
26. Goodman LR, Fumagalli R, Tagliabue P, Tagliabue M, Ferrario M, Gattinoni L, Pesenti A. Adult respiratory distress syndrome due to pulmonary and extrapulmonary causes: CT, clinical, and functional correlations. *Radiology*. 1999;213(2):545-52.
27. Lim CM, Kim EK, Lee JS, Shim TS, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD. Comparison of the response to the prone position between pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2001;27(3):477-85.
28. Davidson TA, Caldwell ES, Curtis JR, Hudson LD, Steinberg KP. Reduced quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome compared with critically ill control patients. *JAMA*. 1999 Jan 27;281(4):354-60
29. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1685-93.
30. Phua J, Badia JR, Adhikari NK, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, Scales DC, Stather DR, Li A, Jones A, Gattas DJ, Hallett D, Tomlinson G, Stewart TE, Ferguson ND. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med*. 179(3):220-7.
31. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, Schoenfeld D, Thompson BT; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Higher versus lower positive end-expiratory pressure in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2004;351: 327-36.
32. Zileberberg MO, Epstein SK. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1159-64

33. Lewandowski K, Metz J, Deutschmann C, Preiss H, Kuhlen R, Artigas A, Falke KJ. Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(4):1121-5.
34. Roca O, Sacanell J, Laborda C, Pérez M, Sabater J, Burgueño MJ, Domínguez L, Masclans JR. [Cohort study on incidence of ARDS in patients admitted to the ICU and prognostic factors of mortality]. *Med Intensiva*. 2006;30(1):6-12.
35. Esteban A, Ferguson ND, Meade MO, Frutos-Vivar F, Apezteguia C, Brochard L, Raymondos K, Nin N, Hurtado J, Tomicic V, González M, Elizalde J, Nightingale P, Abroug F, Pelosi P, Arabi Y, Moreno R, Jibaja M, D'Empaire G, Sandi F, Matamis D, Montañez AM, Anzueto A; VENTILA Group. Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008. 15;177(2):170-7.
36. Villar J, Slutsky AS. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(3):814-6.
37. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1849-61.
38. Thomsen GE, Morris AH. Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(3):965-71.
39. Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD. Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med*. 2003;31(6):1607-11.
40. Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*. 2007;131(2):554-62.
41. Ferring M, Vincent JL. Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure? *Eur Respir J*. 1997;10(6):1297-300.
42. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1334-49.
43. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2731-40.
44. Group ICCT. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management. *Crit Care*. 2008;12(1):R30.
45. Sevransky JE, Martin GS, Shanholtz C, Mendez-Tellez PA, Pronovost P, Brower R, Needham DM. Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury. *Crit Care*. 2009;13(5):R150.
46. Esteban A, Frutos-Vivar F, Muriel A, Ferguson ND, Peñuelas O, Abaira V, Raymondos K, Rios F, Nin N, Apezteguía C, Violi DA, Thille AW, Brochard L, González M, Villagomez AJ, Hurtado J, Davies AR, Du B, Maggiore SM, Pelosi P, Soto L, Tomicic V, D'Empaire G, Matamis D, Abroug F, Moreno RP, Soares MA, Arabi Y, Sandi F, Jibaja M, Amin P, Koh Y, Kuiper MA, Bülow HH, Zeggwagh AA, Anzueto A. Evolution of mortality over time in patients receiving mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(2):220-30.
47. Dirkes S, Dickinson S, Havey R, O'brien D. Prone positioning: is it safe and effective? *Crit Care Nurs Q*. 2012;35(1):64-75.
48. Fröhlich S, Murphy N, Ryan D, Boylan JF. Acute respiratory distress syndrome: current concepts and future directions. *Anaesth Intensive Care*. 2013;41(4):463-72.
49. Cortés I, Peñuelas O, Esteban A. Acute respiratory distress syndrome: evaluation and management. *Minerva Anesthesiol*. 2012;78(3):343-57.

50. Martínez O, Nin N, Esteban A. [Prone position for the treatment of acute respiratory distress syndrome: a review of current literature]. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(6):291-6.
51. Hubmayr RD. Perspective on lung injury and recruitment: a skeptical look at the opening and collapse story. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(12):1647-53.
52. Gattinoni L, Pesenti A. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med*. 2005;31(6):776-84.
53. Ventrice EA, Marti-Sistac O, Gonzalvo R, Villagra A, Lopez-Aguilar J, Blanch L. [Molecular and biophysical mechanisms and modulation of ventilator-induced lung injury]. *Med Intensiva*. 2007;31(2):73-82.
54. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(1):218-33.
55. Robertson B. Surfactant inactivation and surfactant replacement in experimental models of ARDS. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1991;95:22-8.
56. Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, Straube RC, Criner GJ, Davis K, Jr., Kelly KM, Smith TC, Small RJ; Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004. ; 7;291(13):1603-9.
57. Murakami H, Nakao A, Kishimoto W, Nakano M, Takagi H. Detection of O₂- generation and neutrophil accumulation in rat lungs after acute necrotizing pancreatitis. *Surgery*. 1995;118(3):547-54.
58. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem*. 1999;274(15):10053-8.
59. Spieth PM, Gama de Abreu M. Lung recruitment in ARDS: we are still confused, but on a higher PEEP level. *Crit Care*. 2012;16(1):108.
60. Mahmoud KM, Ammar AS. A comparison between two different alveolar recruitment maneuvers in patients with acute respiratory distress syndrome. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2011;1(2):114-20.
61. Constantin JM, Jaber S, Futier E, Cayot-Constantin S, Verny-Pic M, Jung B, Bailly A, Guerin R, Bazin JE. Respiratory effects of different recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2008;12(2):R50.
62. Rouby JJ. Lung overinflation. The hidden face of alveolar recruitment. *Anesthesiology*. 2003;99(1):2-4.
63. Marini JJ, Gattinoni L. Ventilatory management of acute respiratory distress syndrome: a consensus of two. *Crit Care Med*. 2004;32(1):250-5.
64. Zick G, Elke G, Becher T, Schädler D, Pulletz S, Freitag-Wolf S, Norbert W, Frerichs I. Effect of PEEP and Tidal Volume on Ventilation Distribution and End-Expiratory Lung Volume: A Prospective Experimental Animal and Pilot Clinical Study. *PLoS One*. 2013;8(8):e72675.
65. Peñuelas O, Frutos-Vivar F, Fernández C, Anzueto A, Epstein SK, Apezteguía C, González M, Nin N, Raymonds K, Tomicic V, Desmery P, Arabi Y, Pelosi P, Kuiper M, Jibaja M, Matamis D, Ferguson ND, Esteban A; Ventila Group. Characteristics and outcomes of ventilated patients according to time to liberation from mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(4):430-7.
66. Gajic O, Frutos-Vivar F, Esteban A, Hubmayr RD, Anzueto A. Ventilator settings as a risk factor for acute respiratory distress syndrome in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2005;31(7):922-6.

67. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Anzueto A, Alía I, Brower RG, Stewart TE, Apezteguía C, González M, Soto L, Abroug F, Brochard L; Mechanical Ventilation International Study Group. Airway pressures, tidal volumes, and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005;33(1):21-30.
68. Uhlig U, Uhlig S. Ventilation-induced lung injury. *Compr Physiol*. 2011;1(2):635-61.
69. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):294-323.
70. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care*. 2009;13(1):R1
71. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 1993;21(1):131-43.
72. Kuiper JW, Plötz FB, Groeneveld AJ, Haitsma JJ, Jothy S, Vaschetto R, Zhang H, Slutsky AS. High tidal volume mechanical ventilation-induced lung injury in rats is greater after acid instillation than after sepsis-induced acute lung injury, but does not increase systemic inflammation: an experimental study. *BMC Anesthesiol*. 2011;11:26.
73. Wu H, Kobayashi T, Wan Q, Shi W, Qian H, Cui X, Li W. Effects of surfactant replacement on alveolar overdistension and plasma cytokines in ventilator-induced lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010;54(3):354-61.
74. Nin N, Lorente JA, de Paula M, El Assar M, Vallejo S, Peñuelas O, Fernández-Segoviano P, Ferruelo A, Sánchez-Ferrer A, Esteban A. Rats injurious mechanical ventilation show reversible pulmonary, vascular and inflammatory changes. *Intensive Care Med*. 2008;34(5):948-56.
75. Nin N, Lorente JA, Fernandez-Segoviano P, De Paula M, Ferruelo A, Esteban A. High-tidal volume ventilation aggravates sepsis-induced multiorgan dysfunction in a dexamethasone-inhibitable manner. *Shock*. 2009;31(4):429-34.
76. Dreyfuss D, Martin-Lefèvre L, Saumon G. Hyperinflation-induced lung injury during alveolar flooding in rats: effect of perfluorocarbon instillation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1752-7.
77. Guerin C, Richard JC. Current ventilatory management of patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Expert Rev Respir Med*. 2008;2(1):119-33.
78. Marini JJ. Evolving concepts in ventilatory management of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1996; 17: 555-75.
79. (No authors listed) The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1301-8.
80. Esteban A, Alía I, Gordo F, de Pablo R, Suarez J, González G, Blanco J. Prospective randomized trial comparing pressure-controlled ventilation and volume-controlled ventilation in ARDS. For the Spanish Lung Failure Collaborative Group. *Chest*. 2000;117(6):1690-6.
81. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(4):880-4.
82. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(5):1159-64.
83. Parker JC, Townsley MI, Rippe B, Taylor AE, Thigpen J. Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressures. *J Appl Physiol*. 1984;57(6):1809-16.

Bibliografía

84. Egan EA. Lung inflation, lung solute permeability, and alveolar edema. *J Appl Physiol.* 1982;53(1):121-5.
85. Shi C, Boehme S, Hartmann EK, Markstaller K. Novel technologies to detect atelectotrauma in the injured lung. *Exp Lung Res.* 2011;37(1):18-25.
86. Attar MA, Donn SM. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in premature infants. *Semin Neonatol.* 2002;7(5):353-60. Review
87. Dos Santos CC, Slutsky AS. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:585-618.
88. Halbertsma FJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Neth J Med.* 2005;63(10):382-92.
89. Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H, Zwissler B, Hofstetter C. Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respir Med.* 2009;103(3):463-70.
90. Hoegl S, Boost K, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J, Zwissler B, Hofstetter C. Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary barotrauma and systemic inflammation in the rat. *Int J Mol Med.* 2008;21(4):513-9.
91. Tremblay LN, Slutsky SA. Ventilator-induced lung injury: From barotraumas to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110(6):482-488.
92. Barbas CS, de Mattos GF, Borges Eda R. Recruitment maneuvers and positive end-expiratory pressure/tidal ventilation titration in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome: translating experimental results to clinical practice. *Crit Care.* 2005;9(5):424-6.
93. Stamme C, Brasch F, von Bethmann A, Uhlig S. Effect of surfactant on ventilation-induced mediator release in isolated perfused mouse lungs. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002;15(5):455-61.
94. Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(1):109-16.
95. Esteban A, Fernández-Segoviano P, Gordo F, Aramburu J, Alia I, Martín A. Correlation among clinical and post-mortem diagnosis of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;159: 718A.
96. Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(6 Pt 1):1721-5.
97. Karnik AM, Bashir R, Khan FA, Carvounis CP. Renal involvement in the systemic inflammatory reaction syndrome. *Ren Fail.* 1998;20(1):103-16.
98. Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alia I, Brochard L, Stewart TE, Benito S, Epstein SK, Apezteguía C, Nightingale P, Arroliga AC, Tobin MJ; Mechanical Ventilation International Study Group. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA.* 2002;16;287(3):345-55.
99. Ngiam N, Kavanagh BP. Ventilator-induced lung injury: the role of gene activation. *Curr Opin Crit Care.* 2012;18(1):16-22.
100. Syrkina O, Jafari B, Hales CA, Quinn DA. Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. *Respirology.* 2008;13(3):333-40.
101. Reddy SP, Hassoun PM, Brower R. Redox imbalance and ventilator-induced lung injury. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(11):2003-12.
102. Martínez-Caro L, Lorente J, Marín-Corral J, Sánchez-Rodríguez C, Sánchez-Ferrer A, Nin N, Ferruelo A, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Barreiro E, Esteban A. Role of free radicals in

vascular dysfunction induced by high tidal volume ventilation. *Intensive Care Med.* 2009;35(6):1110-9.

103. Britos M, Smoot E, Liu KD, Thompson BT, Checkley W, Brower RG, National Institutes of Health Acute Respiratory Distress Syndrome Network Investigators. The value of positive end-expiratory pressure and Fio₂ criteria in the definition of the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2011;39(9):2025-30.

104. Kallet RH, Branson RD. Respiratory controversies in the critical care setting. Do the NIH ARDS Clinical Trials Network PEEP/FIO₂ tables provide the best evidence-based guide to balancing PEEP and FIO₂ settings in adults? *Respir Care.* 2007;52(4):461-75; discussion 75-7.

105. Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med.* 2004;30(9):1702-14.

106. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 1):L167-73.

107. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;15;171(12):1328-42.

108. Belperio JA, Keane MP, Lynch JP, 3rd, Strieter RM. The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006;27(4):350-64.

109. Elliott AR, Fu Z, Tsukimoto K, Prediletto R, Mathieu-Costello O, West JB. Short-term reversibility of ultrastructural changes in pulmonary capillaries caused by stress failure. *J Appl Physiol.* 1992;73(3):1150-8.

110. Fu Z, Costello ML, Tsukimoto K, Prediletto R, Elliott AR, Mathieu-Costello O, West JB. High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol.* 1992;73(1):123-33.

111. Nin N, Valero J, Lorente J, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Sánchez-Ferrer A, Esteban A. Large tidal volume mechanical ventilation induces vascular dysfunction in rats. *J Trauma.* 2005;59(3):711-6.

112. Huo GD, Cai SX, Chen YH, Chen B. [Effects of serum of rats with ventilator-induced lung injury on endothelial cell permeability and its mechanism]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007;27(7):998-1002.

113. Wang X, Adler KB, Erjefalt J, Bai C. Airway epithelial dysfunction in the development of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Expert Rev Respir Med.* 2007;1(1):149-55.

114. Wang B, Caluch A, Fodil R, Fereol S, Zadigue P, Pelle G, Louis B, Isabey D. Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary micro-vascular endothelial cells. *Biomed Mater Eng.* 2012;22(1-3):163-70.

115. Nin N, Peñuelas O, de Paula M, Lorente J, Fernández-Segoviano P, Esteban A. Ventilation-induced lung injury in rats is associated with organ injury and systemic inflammation that is attenuated by dexamethasone. *Crit Care Med.* 2006;34(4):1093-8.

116. Ranieri V, Giunta F, Suter P, Slutsky A. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2000;284(1):43-4.

117. Spieth PM, Carvalho AR, Pelosi P, Hoehn C, Meissner C, Kasper M, Hübler M, von Neindorff M, Dassow C, Barrenschee M, Uhlig S, Koch T, de Abreu MG. Variable tidal volumes improve lung protective ventilation strategies in experimental lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(8):684-93.

118. Narimanbekov IO, Rozycki HJ. Effect of IL-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model. *Exp Lung Res.* 1995;21(2):239-54.

119. Von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A, Uhlig S. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):263-72.
120. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*. 1997;99(5):944-52.
121. Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky AS. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. *Crit Care Med*. 2002;30(8):1693-700.
122. Haitsma JJ, Uhlig S, Verbrugge SJ, Goggel R, Poelma DL, Lachmann B. Injurious ventilation strategies cause systemic release of IL-6 and MIP-2 in rats in vivo. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003;23(6):349-53.
123. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, Cutz E, Liu M, Keshavjee S, Martin TR, Marshall JC, Ranieri VM, Slutsky AS. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 2003;23-30;289(16):2104-12.
124. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999;7;282(1):54-61.
125. Held HD, Boettcher S, Hamann L, Uhlig S. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(3 Pt 1):711-6.
126. Nahum A, Burke WC, Ravenscraft SA, Marcy TW, Adams AB, Crooke PS, Marini JJ. Lung mechanics and gas exchange during pressure-control ventilation in dogs. Augmentation of CO₂ elimination by an intratracheal catheter. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(4):965-73.
127. Guery BP, Welsh DA, Viget NB, Robriquet L, Fialdes P, Mason CM, Beaucaire G, Bagby GJ, Neviere R. Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability. *Shock*. 2003;19(6):559-63.
128. Stüber F, Wrigge H, Schroeder S, Wetegrove S, Zinserling J, Hoeft A, Putensen C. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2002;28(7):834-41.
129. Choi WI, Quinn DA, Park KM, Moufarrej RK, Jafari B, Syrkina O, Bonventre JV, Hales CA. Systemic microvascular leak in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;15;167(12):1627-32.
130. Martínez-Caro L, Lorente JA, Nin N, El-Assar M, Vallejo S, Sánchez-Ferrer A, Ferruelo A, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Esteban A. Inhibition of nitroxidative stress prevents pulmonary and systemic injury induced by high tidal volume ventilation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Abstracts Issue 2008; 177:A760.(13).
131. Su CL, Du WY, Chiang LL, Lin YK, Lee HL, Chen KH, Wang J Jr, Wang D. Amelioration of superoxide dismutase on ventilator-induced lung injury by suppressing leukocyte in the lungs and systemic circulation. *Chin J Physiol*. 2013;56(4):219-29.
132. Vaneker M, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, Dijkman HB, Snijdelaar DG, Joosten LA, van der Hoeven JG, Scheffer GJ. Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings. *Anesthesiology*. 2007;107(3):419-26.
133. Martínez-Caro L, Nin N, Sánchez-Rodríguez C, Ferruelo A, El Assar M, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Esteban A, Lorente JA. Inhibition of Nitro-Oxidative Stress Attenuates

Pulmonary and Systemic Injury Induced by High-Tidal Volume Mechanical Ventilation. *Shock*. 2015;44(1):36-43.

134. Dreyfuss D, Saumon G. From ventilator-induced lung injury to multiple organ dysfunction? *Intensive Care Med*. 1998;24(2):102-4.

135. Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. *Expert Rev Respir Med*. 2010;4(6):773-83.

136. Chuang KH, Peng YC, Chien HY, Lu ML, Du HI, Wu YL. Attenuation of Lipopolysaccharide-induced Lung Inflammation by Glucosamine in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013.

137. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, Ipaktchi K, Zetoune FS, Sarma JV, Leng L, Huber-Lang MS, Neff TA, Bucala R, Ward PA. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7664-72.

138. Seija M, Baccino C, Nin N, Sánchez-Rodríguez C, Granados R, Ferruelo A, Martínez-Caro L, Ruíz-Cabello J, de Paula M, Noboa O, Esteban A, Lorente JA. Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. *Shock*. 2012;38(4):403-10.

139. Nin N, El-Assar M, Sánchez C, Ferruelo A, Sánchez-Ferrer A, Martínez-Caro L, Rojas Y, Paula MD, Hurtado J, Esteban A, Lorente JA. Vascular dysfunction in sepsis: effects of the peroxynitrite decomposition catalyst MnTMPyP. *Shock*. 2011;36(2):156-61.

140. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):242-9.

141. Brander L, Sinderby C, Lecomte F, Leong-Poi H, Bell D, Beck J, Tsoporis JN, Vaschetto R, Schultz MJ, Parker TG, Villar J, Zhang H, Slutsky AS. Neurally adjusted ventilatory assist decreases ventilator-induced lung injury and non-pulmonary organ dysfunction in rabbits with acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2009;35(11):1979-89.

142. Wang RL, Xu JN, Sheng ZY, Fu HQ. [Effects of different modes of artificial ventilation on lung injury in dog model of acute respiratory distress syndrome]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2006;18(6):334-7.

143. Altemeier WA, Matute-Bello G, Gharib SA, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. Modulation of lipopolysaccharide-induced gene transcription and promotion of lung injury by mechanical ventilation. *J Immunol*. 2005;175(5):3369-76.

144. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, Matute-Bello G. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest*. 2006;86:790-9.

145. O'Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, Dhanireddy S, Frevert CW, Liggitt D, Martin TR, Matute-Bello G. Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care*. 2006;10(5):R136.

146. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L379-99.

147. Plötz FB, Vreugdenhil HA, Slutsky AS, Zijlstra J, Heijnen CJ, van Vught H. Mechanical ventilation alters the immune response in children without lung pathology. *Intensive Care Med*. 2002;28(4):486-92.

148. Nin N, Lorente JA, De Paula M, Fernandez-Segoviano P, Peñuelas O, Sanchez-Ferrer A, Martínez-Caro L, Esteban A. Aging increases the susceptibility to injurious mechanical ventilation. *Intensive Care Med*. 2008;34(5):923-31.

149. Vion AC, Birukova AA, Boulanger CM, Birukov KG. Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism. *Pulm Circ.* 2013;3(1):95-9.
150. Cardoso PF, Pazetti R, Moriya HT, Pego-Fernandes PM, Almeida FM, Correia AT, Fechini K, Jatene FB. An experimental rat model of ex vivo lung perfusion for the assessment of lungs after prostacyclin administration: inhaled versus parenteral routes. *J Bras Pneumol.* 2011;37(5):589–97.
151. Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Elki S, Haverich A. Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18(12):1198–201.
152. Pêgo-Fernandes P, Werebe E, Cardoso P, Pazetti R, Oliveira K, Soares P, Jatene FB. Experimental model of isolated lung perfusion in rats: first Brazilian experience using the IL-2 isolated perfused rat or guinea pig lung system. *Transplant Proc.* 2010;42(2):444-7.
153. Algaba A, Martínez-Caro L, Nin N, Ferruelo A, El-Assar M, Peñuelas O, Sánchez-Ferrer A, Lorente JA, Fernández-Segoviano P, Esteban E. Efectos de la inhibición de la ciclooxygenasa en un modelo experimental de daño pulmonar inducido por volúmenes corrientes elevados. *Med Intensiva* 2008;32 Supl 2:1-122.
154. Peñuelas O, Melo E, Sánchez C, Sánchez I, Quinn K, Ferruelo A, Pérez-Vizcaíno F, Esteban A, Navajas D, Nin N, Lorente JA, Farré R. Antioxidant effect of human adult adipose-derived stromal stem cells in alveolar epithelial cells undergoing stretch. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;188(1):1-8
155. Vaschetto R, Kuiper JW, Musters RJ, Eringa EC, Della Corte F, Murthy K, Groeneveld AB, Plötz FB. Renal hypoperfusion and impaired endothelium-dependent vasodilation in an animal model of VILI: the role of the peroxynitrite-PARP pathway. *Crit Care.* 2010;14(2):R45.
156. Chu EK, Whitehead T, Slutsky AS. Effects of cyclic opening and closing at low- and high-volume ventilation on bronchoalveolar lavage cytokines. *Crit Care Med.* 2004;32(1):168-74.
157. Marín-Corral J, Martínez-Caro L, Lorente JA, de Paula M, Pijuan L, Nin N, Gea J, Andrés E, Barreiro E. Redox balance and cellular inflammation in the diaphragm, limb muscles, and lungs of mechanically ventilated rats. *Anesthesiology.* 2010;112(2):384-94.
158. Farre R, Granell S, Rotger M, Serrano-Mollar A, Closa D, Navajas D. Animal model of unilateral ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 2005 Mar;31(3):487-90. Epub 2005 Jan 25
159. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
160. Preti SC, da Cunha V, Vassallo DV, Stefanon I. The superoxide dismutase mimetic, tempol, reduces the bioavailability of nitric oxide and does not alter L-NAME-induced hypertension in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:29–34.
161. Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, Miura H, Sukhotnik I, Larsen BT, Selle RM, Moulder JE, Gutterman DD. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:287–94.
162. Martin TR, Matute-Bello G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. *Crit Care Clin.* 2011;27(3):735-52.
163. Broccard AF, Feihl F, Vannay C, Markert M, Hotchkiss J, Schaller MD. Effects of L-NAME and inhaled nitric oxide on ventilator-induced lung injury in isolated, perfused rabbit lungs. *Crit Care Med.* 2004;32(9):1872-8.
164. Kapetanakis, T. Siempos II, Metaxas EI, Kopterides P, Agrogiannis G, Patsouris E, Lazaris AC, Stravodimos KG, Roussos C, Armaganidis A. Metabolic acidosis may be as protective as

hypercapnic acidosis in an ex-vivo model of severe ventilator-induced lung injury: a pilot study. *BMC Anesthesiol*;2011;13(11):8.

165. Jaecklin T, Engelberts D, Otulakowski G, O'Brodivich H, Post M, Kavanagh BP. Lung-derived soluble mediators are pathogenic in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(4):L648-58.

166. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(5):725-38.

167. Welsh DA, Summer WR, Dobard EP, Nelson S, Mason CM. Keratinocyte growth factor prevents ventilator-induced lung injury in an ex vivo rat model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3 Pt 1):1081-6.

168. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1974;110(5):556-65.

169. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan AC. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* (1985). 1987;62(1):27-33.

170. Kolobow T, Moretti MP, Fumagalli R, Mascheroni D, Prato P, Chen V, Joris M. Severe impairment in lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. An experimental study. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135(2):312-5.

171. Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N, Nishimura M, Ohta N, Kiyono H. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg*. 2001;92(2):428-36.

172. Kuchnicka K, Maciejewski D. Ventilator-associated lung injury. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2013;45(3):164-70.

173. Kubiak BD, Gatto LA, Jimenez EJ, Silva-Parra H, Snyder KP, Vieau CJ, Barba J, Nasser-Nik N, Falk JL, Nieman GF. Plateau and transpulmonary pressure with elevated intra-abdominal pressure or atelectasis. *J Surg Res*. 2010;159(1):e17-24.

174. Plataki M, Hubmayr RD. The physical basis of ventilator-induced lung injury. *Expert Rev Respir Med*. 2010;4(3):373-85.

175. Kim J H, Suk MH, Yoon DW, Kim HY, Jung KH, Kang EH, Lee SY, Lee SY, Suh IB, Shin C, Shim JJ, In KH, Yoo SH, Kang KH. Inflammatory and transcriptional roles of poly (ADP-ribose) polymerase in ventilator-induced lung injury. *Crit Care*. 2008;12(4):R108.

176. Meyer NJ, Huang Y, Singleton PA, Sammani S, Moitra J, Evenoski CL, Husain AN, Mitra S, Moreno-Vinasco L, Jacobson JR, Lussier YA, Garcia JG. GADD45a is a novel candidate gene in inflammatory lung injury via influences on Akt signaling. *FASEB J*. 2009;23(5):1325-37.

177. Nishimura M, Honda O, Tomiyama N, Johkoh T, Kagawa K, Nishida T. Body position does not influence the location of ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med*. 2000;26(11):1664-9.

178. Gattinoni L, Pesenti A, Baglioni S, Vitale G, Rivolta M, Pelosi P. Inflammatory pulmonary edema and positive end-expiratory pressure: correlations between imaging and physiologic studies. *J Thorac Imaging*. 1988;3(3):59-64.

179. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Sep;138(3):720-3.

180. (No authors listed). Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(5 Pt 2):S169-202.
181. Carré PC, Mortenson RL, King TE Jr, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1802-10.
182. Lynch JP 3rd, Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, Strieter RM. Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. The role of interleukin-8. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(6):1433-9.
183. Drent M, Mulder PG, Wagenaar SS, Hoogsteden HC, van Velzen-Blad H, van den Bosch JM. Differences in BAL fluid variables in interstitial lung diseases evaluated by discriminant analysis. *Eur Respir J.* 1993 Jun;6(6):803-10.
184. Mokart D, Kipnis E, Guerre-Berthelot P, Vey N, Capo C, Sannini A, Brun JP, Blache JL, Mege JL, Blaise D, Guery BP. Monocyte deactivation in neutropenic acute respiratory distress syndrome patients treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Crit Care.* 2008;12(1):R17.
185. Mokart D, van Craenenbroeck T, Lambert J, Textoris J, Brun JP, Sannini A, Chow-Chine L, Hamouda S, Fouché L, Etori F, Faucher M, Blache JL. Prognosis of acute respiratory distress syndrome in neutropenic cancer patients. *Eur Respir J.* 2012;40(1):169-76.
186. Henderson RF. Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. *Environ Health Perspect.* 1984;56:115-29.
187. Behnia R, Molteni A, Waters CM, Panos RJ, Ward WF, Schnaper HW, TS'ao CH. Early markers of ventilator-induced lung injury in rats. *Ann Clin Lab Sci.* 1996;26(5):437-50.
188. Cobben NA, Drent M, Jacobs JA, Schmitz MP, Mulder PG, Henderson RF, Wouters EF, van Dieijen-Visser MP. Relationship between enzymatic markers of pulmonary cell damage and cellular profile: a study in bronchoalveolar lavage fluid. *Exp Lung Res.* 1999;25(2):99-111.
189. Lu ZM, Zhang YC, Zhang JS, Shi BL, Jia TJ, Tang HW, Liu JH. [Enzyme change in bronchoalveolar lavage fluid of pneumocystis pneumonia rats and the effect of garlicin treatment]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2007;25(4):300-3.
190. Roth, R. A. Effect of pneumotoxins on lactate dehydrogenase activity in airways of rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981 Jan;57(1):69-78.
191. Driscoll KE, Maurer JK, Lindenschmidt RC, Romberger D, Rennard SI, Crosby L. Respiratory tract responses to dust: relationships between dust burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release, and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;106(1):88-101.
192. Hoffman RM, Rogers RM. Serum and lavage lactate dehydrogenase isoenzymes in pulmonary alveolar proteinosis. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(1):42-6.
193. Matusiewicz SP, Williamson IJ, Sime PJ, Brown PH, Wenham PR, Crompton GK, Greening AP. Plasma lactate dehydrogenase: a marker of disease activity in cryptogenic fibrosing alveolitis and extrinsic allergic alveolitis? *Eur Respir J.* 1993;6(9):1282-6.
194. Schultze AE, Gunaga KP, Wagner JG, Hoorn CM, Moorehead WR, Roth RA. Lactate dehydrogenase activity and isozyme patterns in tissues and bronchoalveolar lavage fluid from rats treated with monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;126(2):301-10.
195. Schmolling J, Seeger W, Jensen A. Liquid movements in ventilated and perfused isolated lungs of fetal sheep at 0.87, 0.90, and 0.95 of term. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(5):1345-50.

196. Sakai T, Ishizaki T, Nakai T, Matsukawa S, Hayakawa M, Ozawa T. [Mitochondrial dysfunction in acute lung injury caused by endothelial-1 and leukotoxin]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1996;34(8):843-9.
197. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology*. 2000;92(3):833-40.
198. Ghazi-Khansari M, Nasiri G, Honarjoo M. Decreasing the oxidant stress from paraquat in isolated perfused rat lung using captopril and niacin. *Arch Toxicol*. 2005;79(6):341-5.
199. Zhu G, Zhou X, Min J. [Pulmonary surfactant impairment in the development of ventilator-induced lung injury in rats]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2001;24(11):647-50.
200. Zhu S, Basiouny KF, Crow JP, Matalon S. Carbon dioxide enhances nitration of surfactant protein A by activated alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(5):L1025-31.
201. Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(4):1487-500.
202. Adding LC, Agvald P, Persson MG, Gustafsson LE. Regulation of pulmonary nitric oxide by carbon dioxide is intrinsic to the lung. *Acta Physiol Scand*. 1999;167(2):167-74.
203. Hegeman MA, Hemmes SN, Kuipers MT, Bos LD, Jongsma G, Roelofs JJ, van der Sluijs KF, Juffermans NP, Vroom MB, Schultz MJ. The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation. *Crit Care Res Pract*. 2013;2013:435236.
204. Wilson MR, Takata M. Inflammatory mechanisms of ventilator-induced lung injury: a time to stop and think? *Anaesthesia*. 2013;68(2):175-8.
205. Elias JA, Freundlich B, Kern JA, Rosenbloom J. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest*. 1990;97(6):1439-45.
206. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(3):765-88.
207. Bendtzen K. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett*. 1994;43(1-2):111-23.
208. Abraham E, Coulson WF, Schwartz MD, Allbee J. Effects of therapy with soluble tumour necrosis factor receptor fusion protein on pulmonary cytokine expression and lung injury following haemorrhage and resuscitation. *Clin Exp Immunol*. 1994;98(1):29-34.
209. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol*. 1995;154(10):5492-9.
210. Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S, Muhl H, Zwissler B. Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. *Crit Care Med*. 2005;33(10):2317-22.
211. Lee HS, Wang Y, Maciejewski BS, Esho K, Fulton C, Sharma S, Sanchez-Esteban J. Interleukin-10 protects cultured fetal rat type II epithelial cells from injury induced by mechanical stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(2):L225-32.
212. Gurkan OU, He C, Zielinski R, Rabb H, King LS, Dodd-o JM, D'Alessio FR, Aggarwal N, Pearce D, Becker PM. Interleukin-6 mediates pulmonary vascular permeability in a two-hit model of ventilator-associated lung injury. *Exp Lung Res*. 2011;37(10):575-84.
213. Ko YA, Yang MC, Huang HT, Hsu CM, Chen LW. NF- κ B activation in myeloid cells mediates ventilator-induced lung injury. *Respir Res*. 2013 3;14:69.

214. Gattinoni L, Presenti A, Torresin A, Baglioni S, Rivolta M, Rossi F, Scarani F, Marcolin R, Cappelletti G. Adult respiratory distress syndrome profiles by computed tomography. *J Thorac Imaging*. 1986;1(3):25-30.
215. Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Hassoun PM, Garcia JG, Birukov KG, Reddy SP. EGFR-activated signaling and actin remodeling regulate cyclic stretch-induced NRF2-ARE activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(3):304-12.
216. Wallace MJ, Probyn ME, Zahra VA, Crossley K, Cole TJ, Davis PG, Morley CJ, Hooper SB. Early biomarkers and potential mediators of ventilation-induced lung injury in very preterm lambs. *Respir Res*. 2009;10;10:19.
217. Siegl S, Uhlig S. Using the one-lung method to link p38 to pro-inflammatory gene expression during overventilation in C57BL/6 and BALB/c mice. *PLoS One*. 2012;7(7):e41464.
218. Trummer-Menzi E, Gremlich S, Schittny JC, Dénervaud V, Stampanoni M, Post M, Gerber S, Roth-Kleiner M. Evolution of gene expression changes in newborn rats after mechanical ventilation with reversible intubation. *Pediatr Pulmonol*. 2012;47(12):1204-14.
219. Belopolskaya OB, Smelaya TV, Moroz VV, Golubev AM, Salnikova LE. Clinical associations of host genetic variations in the genes of cytokines in critically ill patients. *Clin Exp Immunol*. 2015;180(3):531-41.
220. Ricard J D, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(5):1176-80.
221. Pedreira PR, García-Prieto E, Parra D, Astudillo A, Diaz E, Taboada F, Albaiceta GM. Effects of melatonin in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(5):L820-7.
222. Albaiceta GM, Gutierrez-Fernández A, García-Prieto E, Puente XS, Parra D, Astudillo A, Campestre C, Cabrera S, Gonzalez-Lopez A, Fueyo A, Taboada F, López-Otin C. Absence or inhibition of matrix metalloproteinase-8 decreases ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(5):555-63.
223. dos Santos CC, Shan Y, Akram A, Slutsky AS, Haitsma JJ. Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 15;183(4):471-82.
224. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*. 1995;107(4):1062-73.
225. Takala A, Jousela I, Takkunen O, Kautiainen H, Jansson SE, Orpana A, Karonen SL, Repo H. A prospective study of inflammation markers in patients at risk of indirect acute lung injury. *Shock*. 2002;17(4):252-7.
226. Goldman JL, Sammani S, Kempf C, Saadat L, Letsiou E, Wang T, Moreno-Vinasco L, Rizzo AN, Fortman JD, Garcia JG. Pleiotropic effects of interleukin-6 in a "two-hit" murine model of acute respiratory distress syndrome. *Pulm Circ*. 2014;4(2):280-8.
227. Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, Mantell LL, Einarsson O, Du Y, Elias JA. Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(5):535-42.
228. Saito F, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Ogawa Y, Yamada W, Shiraishi Y, Hasegawa N, Fujishima S, Takano H, Ishizaka A. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38(5):566-71.
229. Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, Kim SS, Koff J, Mao Y, Frank JA. Neutrophil-derived IL-6 limits alveolar barrier disruption in experimental ventilator-induced lung injury. *J Immunol*. 2009;182(12):8056-62.

230. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Analytic review: Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care: part I: basic science. *J Intensive Care Med*. 2011;26(1):3-12.
231. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.
232. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med*. 1996;125(3):191-6.
233. Dolinay T, Kaminski N, Felgendreher M, Kim HP, Reynolds P, Watkins SC, Karp D, Uhlig S, Choi AM. Gene expression profiling of target genes in ventilator-induced lung injury. *Physiol Genomics*. 2006;26(1):68-75.
234. Repine, JE. Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome. *Lancet*. 1992;339(8791):466-9.
235. Macnee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):195-207.
236. Cheng YJ, Chan KC, Chien CT, Sun WZ, Lin CJ. Oxidative stress during 1-lung ventilation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(3):513-8.
237. Roberts AM. Central role of oxidative stress and its signaling pathways in causing and preventing acute lung injury. *Crit Care Med*. 2011;39(12):2776-7.
238. Pires KM, Melo AC, Lanzetti M, Casquilho NV, Zin WA, Porto LC, Valença SS. Low tidal volume mechanical ventilation and oxidative stress in healthy mouse lungs. *J Bras Pneumol*. 2012;38(1):98-104.
239. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5):L834-41.
240. Chess PR, O'Reilly MA, Sachs F, Finkelstein JN. Reactive oxidant and p42/44 MAP kinase signaling is necessary for mechanical strain-induced proliferation in pulmonary epithelial cells. *J Appl Physiol* (1985). 2005;99(3):1226-32.
241. Halliwell B1, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992;119(6):598-620.
242. Marín-Corral J, Martínez-Caro L, Lorente JA, de Paula M, Pijuan L, Nin N, Gea J, Andrés E, Barreiro E. Redox balance and cellular inflammation in the diaphragm, limb muscles, and lungs of mechanically ventilated rats. *Anesthesiology*. 2010;112(2):384-94.
243. Quinlan GJ, Lamb NJ, Tilley R, Evans TW, Gutteridge JM. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(2):479-84.
244. Hammerschmidt S, Sandvoss T, Gessner C, Schauer J, Wirtz H. High in comparison with low tidal volume ventilation aggravates oxidative stress-induced lung injury. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1637(1):75-82.
245. Hammerschmidt S, Schiller J, Kuhn H, Meybaum M, Gessner C, Sandvoss T, Arnold K, Wirtz H. Influence of tidal volume on pulmonary NO release, tissue lipid peroxidation and surfactant phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1639(1):17-26.
246. Li LF, Kao KC, Yang CT, Huang CC, Liu YY. Ethyl pyruvate reduces ventilation-induced neutrophil infiltration and oxidative stress. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012;237(6):720-7.

247. Davidovich N, DiPaolo BC, Lawrence GG, Chhour P, Yehya N, Margulies SS. Cyclic stretch-induced oxidative stress increases pulmonary alveolar epithelial permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49(1):156-64.
248. Chacon-Cabrera A, Rojas Y, Martínez-Caro L, Vila-Ubach M, Nin N, Ferruelo A, Esteban A, Lorente JA, Barreiro E. Influence of mechanical ventilation and sepsis on redox balance in diaphragm, myocardium, limb muscles, and lungs. *Transl Res.* 2014;164(6):477-95.
249. Kraft SA, Fujishima S, McGuire GP, Thompson JS, Raffin TA, Pearl RG. Effect of blood and albumin on pulmonary hypertension and edema in perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1995;78(2):499-504.
250. Fukuse T, Hirata T, Liu CJ, Ueda M, Nakamura T, Hitomi S, Wada H. Assessment of preserved lung function in an ex vivo rat model perfused with homologous blood. *Transplant Proc.* 1996;28(3):1832-3.
251. Fukuse T, Albes JM, Takahashi Y, Brandes H, Hausen B, Schäfers HJ. Influence of red blood cells on lung function in an ex vivo rat heart-lung model. *J Surg Res.* 1995;59(3):399-404
252. Kerr JS, Baker NJ, Bassett DJ, Fisher AB. Effect of perfusate glucose concentration on rat lung glycolysis. *Am J Physiol.* 1979 Mar;236(3):E229-33.
253. Niemeier RW. The isolated perfused lung. *Environ Health Perspect.* 1984;56:35-41. Review.
254. Chang RS, Wright K, Effros RM. Role of albumin in prevention of edema in perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1981;50(5):1065-70.
255. Czartolomna J, Voelkel NF, Chang SW. Permeability characteristics of isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1991;70(4):1854-60.
256. Brasile L, Stubenitsky BM, Booster MH, Arenada D, Haisch C, Kootstra G. Transfection and transgene expression in a human kidney during ex vivo warm perfusion. *Transplant Proc.* 2002;34(7):2624.
257. Evans CL, Hsu FY, Kosaka T. Utilization of blood sugar and formation of lactic acid by the lungs. *J Physiol.* 1934;82(1):41-61.
258. Fisher AB, Steinberg H, Bassett D. Energy utilization by the lung. *Am J Med.* 1974;57(3):437-46.
259. Young SL, O'Neil JJ, Kasuyama RS, Tierney DF. Glucose utilization by edematous rat lungs. *Lung.* 1980;157(3):165-77.
260. Izquierdo-García JL, Naz S, Nin N, Rojas Y, Erazo M, Martínez-Caro L, García A, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Casals C, Esteban A, Ruiz-Cabello J, Barbas C, Lorente JA. A Metabolomic Approach to the Pathogenesis of Ventilator-induced Lung Injury. *Anesthesiology.* 2014;120(3):694-702.
261. Fisher AB, Dodia C. Lactate and regulation of lung glycolytic rate. *Am J Physiol.* 1984 May;246(5 Pt 1):E426-9.
262. Tierney DF, Young SL, O'Neil JJ, Abe M. Isolated perfused lung substrate utilization. *Fed Proc.* 1977;36(2):161-5.
263. Rhoades RA. Isolated perfused lung preparation for studying altered gaseous environments. *Environ Health Perspect.* 1984;56:43-50.
264. Wiebe K, Poeling J, Meliss R, Loss M, Winkler M, Steinhoff G, Haverich A. Improved function of transgenic pig lungs in ex vivo lung perfusion with human blood. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):773-4.
265. White CW, Hasanally D, Mundt P, Li Y, Xiang B, Klein J, Müller A, Ambrose E, Ravandi A, Arora RC, Lee TW, Hryshko LV, Large S, Tian G, Freed DH. A whole blood-based perfusate

- provides superior preservation of myocardial function during ex vivo heart perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(1):113-21.
266. Starling E. H. Principles of human physiology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1920;713-714.
267. Robicsek F, Pruitt JR, Sanger PW, Daugherty HK, Moore M, Bagby E. The maintenance of function of the donor heart in the extracorporeal stage and during transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1968;6:330.
268. LoCicero J 3rd, Massad M, Matano J, Khasho F, Greene R. Aerodynamic evaluation of crystalloid and colloid flush perfusion for lung preservation. *J Surg Res*. 1990;49(6):469-75
269. Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, Guerreiro Cardoso PF, Schaefers HJ, Brito J, Keshavjee SH, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989;98(3):333-42. PMID: 2770316
270. Semik M, Konertz W, Möller F, Bernhard A. Successful 24-hour preservation of the lung--evaluation of viability in a rat model. *Transplant Proc*. 1987;19(5):4171-2.
271. DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky AS, Post M, Patterson GA. Assessment of postpreservation rat lung function using a new model for extended venous reperfusion. *J Appl Physiol* (1985). 1993;75(4):1890-6.
272. Van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM, Schwartz BA, Moldow CF, Jacob HS. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science*. 1985;227(4688):756-9.
273. Jensen LS, Andersen AJ, Christiansen PM, Hokland P, Juhl CO, Madsen G, Mortensen J, Møller-Nielsen C, Hanberg-Sørensen F, Hokland M. Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *Br J Surg*. 1992;79(6):513-6.
274. Kaplan J, Sarnaik S, Gitlin J, Lusher J. Diminished helper/suppressor lymphocyte ratios and natural killer activity in recipients of repeated blood transfusions. *Blood*. 1984;64(1):308-10.
275. Waymack JP, Alexander JW. Blood transfusions as an immunomodulator--a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1986;9(2-3):177-83.
276. Waymack JP, Balakrishnan K, McNeal N, Gonce S, Miskell P, Warden GD, Alexander JW. Effect of blood transfusions on macrophage-lymphocyte interaction in an animal model. *Ann Surg*. 1986;204(6):681-5.
277. Waymack JP, Gallon L, Barcelli U, Alexander JW. Effect of blood transfusions on macrophage function in a burned animal model. *Curr Surg*. 1986;43(4):305-7.
278. Adkins WK, Hernandez LA, Coker PJ, Buchanan B, Parker JC. Age effects susceptibility to pulmonary barotrauma in rabbits. *Crit Care Med*. 1991;19(3):390-3.
279. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172(5):2731-8.
280. Tremblay LN, Yamashiro T, DeCampos KN, Mestrinho BV, Slutsky AS, Todd TR, Keshavjee SH. Effect of hypotension preceding death on the function of lungs from donors with nonbeating hearts. *J Heart Lung Transplant*. 1996;15(3):260-8.
281. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Eur Respir J Suppl*. 2003;42:2s-9s.

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía.” Frankenstein. Mary Shelley*